

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

N°:

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par : Rahrah Salssabil, Toumi Chaima, Tour Farida

Intitulé

**Isolement et identification phénotypique des *Lactobacillus*
isolés a partir de Jben traditionnel et étude de l'effet
antibactérien vis-à-vis de *Listeria monocytogene***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. GUETOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. ARIECH Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur
Pr. MEDJEKAL Samir	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Mlle. NAIDJI Meriem	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Co- Rapporteur

2023/2024

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu « **notre Dieu** » qui nous a donné la santé, la volonté, le courage et la patience tout au long de nos études.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr. GUETOUACHE MOURAD**,

On le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

On remercie **Naidji Meri** pour son soutien et son appui.

On tient à présenter nos sincères remerciements à tous les membres du jury :

Mme. **Areich Mounira** De nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mr. Medjkel d'avoir pris le temps d'examiner

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire.

Enfin, nos profonds remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

الاهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

"وآخر دعوانهم ان الحمد لله رب العالمين"

لكل امنية موعده وهاهو موعدي مع امنيتي لم تكن الرحلة قصيرة ولم يكن الحلم قريب ولا كان الطريق محفوفاً
بالتسهيلات لكنني نلتها وفعلتها بفضل: الله ثم ابي و امي اذا كانت امي هي الجنة فأنت يا ابي بابها اهدي تحياتي الى نعمة
الحياة اخوتي والى سندي زوجي والى عائلتي الكبيرة بالخصوص عمي والى صديقات العمر دمت لي



شيماء

الحمد لله الذي هيا البدء ويسر اليسر وطيب المنتهى، بقلب ممتلئ بالامتنان أحمد الله ثم أشكروالديّ الأعزاء كلمات
الشكر تبدو قليلة أمام تضحياتكمما الكبير. أهدي تحياتي لاختوتي شركاء الحياة ووفاء الدرب. إلى شريك حياتي، رفيق دربي،
وأعز الناس إلى قلبي أشكرك على إيمانك بي ودعمك المستمر لطموحاتي وأحلامي، والى صديقاتي الذين جعلوا كل يوم
مشرقاً في حياتي



سلسيل

اجمل لحظة هي ان يتحقق ما صبرت و تعبتي لأجله، اهدي تخرجي هذا بكل فخر و اعتزاز إلى روح والدي العزيز الذي

علمني القوة و الصبر و الاصرار، رحمك الله و جعل مثواك الجنة

الى امي الغالية والى اخوتي، عائلتي الكريمة واساتذتي الافاضل، والى من عرفت معنى الحياة الدراسية بوجودهم زميلاتي

من بداية المشوار وحتى هذه اللحظة الجميلة



فريدة

Sommaire

ملخص	i
Abstract.....	ii
Résumé	iii
Liste des abréviations	iv
Liste des figures.....	v
Listes des tableaux.....	vi
Introduction	1
Chapitre I. Etude bibliographique.....	2
I.1. Produits laitiers traditionnels :.....	2
I.2. Jben :	3
I.2.1. Préparation de jben :	3
I.2.2. Caractéristiques physiques et chimiques du Jben :	4
I.2.3. Microflore de Jben :	4
I.3. Les bactéries lactiques.....	5
I.3.1. caractéristique général des bacteries lactique:.....	5
I.3.2. Classification.....	5
I.3.3. Habitat de lactobacillus:.....	8
I.3.4. Méthodes d'étude et d'identification des bactéries lactiques	8
I.3.5. Méthodes phénotypiques:	9
I.3.6. Méthodes génotypiques:	9
I.4. Listeria monocytogenes :	11
I.4.1. Historique :.....	11
I.4.2. Habitat :.....	11
I.4.3. Caractéristiques biologiques :	12

I.4.4.	Les caractères biochimiques et cultureux:	13
I.4.5.	Pouvoir pathogène et implication dans la contamination alimentaire :	14
I.4.6.	Listeria monocytogenes dans le Lait et les produits laitiers :	15
I.5.	Les bactériocines des bactéries lactiques	15
I.5.1.	Définition et caractéristiques principales	15
I.5.2.	Nomenclature :	16
I.5.3.	Nature :	16
I.5.4.	Caractéristiques:	16
I.5.5.	Propriétés des bactériocines:	16
I.5.6.	Classification:	17
I.5.7.	Mode d'action	17
Chapitre II.	Matériel et méthodes :	21
II.1.1.	Objectif de l'étude :	21
II.1.2.	Échantillonnage :	21
II.1.3.	Analyse microbiologique :	21
II.1.4.	Analyse préliminaire des isolats :	23
II.1.5.	L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre les agents pathogènes d'origine: 25	
II.1.6.	Test d'interaction entre les bactéries lactiques et listeria monocytogene :	26
Chapitre III.	Résultats et Discussion	30
III.1.	Analyse microbiologie :	30
III.1.1.	Examen macrobiologie et microbiologie :	30
III.1.2.	Teste biochimique:	31
III.1.3.	Purification :	32
III.1.4.	Etude fermentaire :	32
III.1.5.	Test d'interaction entre les bactéries lactiques et listeria monocytogene :	33
III.1.6.	Test de dégradation des sucres :	34

Conclusion	30
Références bibliographiques.....	31
Annexes	31

ملخص

من بين منتجات الألبان الجزائرية التقليدية يبرز الجبن التقليدي كجزء مهم من غذاء الإنسان، والذي يتم تصنيعه في عدة مناطق من الجزائر باستخدام طرق متنوعة.

أجريت هذه الدراسة في ولاية المسيلة وتهدف إلى التوصيف الميكروبيولوجي لهذا الجبن. تم التركيز على البحث عن سلالات بكتيرية قادرة على إنتاج مواد مضادة للميكروبات يدخل في تركيب الجبن التقليدي. عزلت بكتيريا حمض اللبن استناداً إلى الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية، مما أتاح الحصول على سلالات من نوع *Lactobacillus* (موجبة الغرام وسالبة الكتالاز) التي تم تنقيتها وتخزينها.

أظهرت اختبارات النشاط المضاد للبكتيريا أن سلالات بكتيريا اللبن المعزولة أظهرت نشاطاً مثبطاً ضد العزلات الممرضة من نوع *Listeria monocytogenes* ، حيث بينت 10 عزلات منها قدرة تثبيطية عالية من خلال إنتاج مركبات حيوية تعرف بالباكتريوسين.

الكلمات المفتاحية: الجبن التقليدي، *Lactobacillus*، المواد المضادة للميكروبات، بكتيريا حمض اللبن، الباكترىوسين،

Listeria monocytogenes.

Abstract

Among the traditional Algerian dairy products, traditional cheese stands out as an important part of human diet, made in several regions of Algeria using various methods.

This study was conducted in the wilaya of M'sila and aims to characterize this cheese physically, chemically, and microbiologically. The focus was on searching for bacterial strains capable of producing antimicrobial substances within the traditional cheese.

Lactic acid bacteria were isolated based on their morphological and biochemical profiles, allowing for the acquisition of strains of the type *Lactobacillus* (Gram-positive and catalase-negative) which were purified and stored.

Antibacterial activity tests showed that the isolated lactic acid bacteria strains exhibited inhibitory activity against pathogenic isolates of *Listeria monocytogenes*. Ten of these isolates demonstrated a high inhibitory capacity through the production of bioactive compounds called bacteriocins.

Keywords: traditional cheese, *Lactobacillus*, antimicrobial substances, lactic acid bacteria, bacteriocins, *Listeria monocytogenes*.

Résumé

Parmi les produits laitiers traditionnels algériens, le fromage traditionnel se distingue comme une partie importante de l'alimentation humaine, fabriqué dans plusieurs régions d'Algérie en utilisant des méthodes variées.

Cette étude a été réalisée dans la wilaya de M'sila et vise à caractériser physiquement, chimiquement et microbiologiquement ce fromage. L'accent a été mis sur la recherche de souches bactériennes capables de produire des substances antimicrobiennes dans le fromage traditionnel.

Les bactéries lactiques ont été isolées sur la base de leurs profils morphologiques et biochimiques, permettant d'obtenir des souches de type *Lactobacillus* (Gram-positives et catalase-négatives) qui ont été purifiées et stockées.

Les tests d'activité antibactérienne ont montré que les souches de bactéries lactiques isolées présentaient une activité inhibitrice contre les isolats pathogènes de *Listeria monocytogenes*. Dix de ces isolats ont montré une forte capacité inhibitrice grâce à la production de composés bioactifs appelés bactériocines.

Mots-clés : fromage traditionnel, *Lactobacillus*, substances antimicrobiennes, bactéries lactiques, bactériocines, *Listeria monocytogenes*.

Liste des abréviations

MRS: Man-Rogosa et Sharp

MH: Mueller-Hinton

PCA: plate count agar

LAB: Lactobacillus

BL: Bactéries lactiques

LM: *Listeria monocytogenes*

Liste des figures

Figure 1: Schéma de la fabrication des produits laitiers traditionnels.....	3
Figure 2: Arbre phylogénétique des bactéries et comparaison avec les genres Aerococcus,Listeria, Staphylococcus et Bacillus	8
Figure 3: Différentes approches moléculaires appliquées à l'écologie microbiennes des aliments	10
Figure 4: Micrographie de L.monocytogenes (National Institutes of Health,United States Département of Health and Human Services, February 2004)	13
Figure 5: préparation des séries de dilution de jben pour isolement des bactéries lactiques .	22
Figure 6: Méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobienne. (a) méthode de la double couche, (b) méthode de diffusion en puits	27
Figure 7: Aspectmacroscopique des souches BL sur les milieux solides MRS.	30
Figure 8: Aspect macroscopique des souches BL sur bouillons MRS	31
Figure 9: Aspect microscopique des souches BL après coloration de Gram	31
Figure 10: Résultat de teste catalase.....	32
Figure 11: Ensemencant en stries et purification des souche bactérie lactique.....	32
Figure 12: La croissance des souches de lactobacillus dans des tubes contenant le milieu MRS Bouillon et les tubes de cloche de Durham.	33
Figure 13: Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de listeria monocytogène (Méthode indirecte).....	34
Figure 14: Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de listeria monocytogène (Méthode directe).....	34
Figure 15 : Résultats de dégradation de sucre sur Micro blaque.....	35

Listes des tableaux

Tableau 1: les différents genres de bactéries lactiques**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 2 : classification des bactériocines des bactéries lactiques**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 3: dégradation de sucre à partir les souches isolées35

Introduction

Introduction :

En Algérie, la consommation de lait et de ses dérivés est très élevée, atteignant en moyenne 120 litres par habitant en 2013, bien au-dessus des 83 litres en Tunisie et des 64 litres au Maroc (Kacimi et Hassani, 2013). Cette forte consommation se traduit par une diversité de produits laitiers consommés, allant du lait reconstitué ou recombinaison aux yaourts et au lait caillé. Par ailleurs, la transformation commerciale du lait de vache en produits traditionnels locaux tels que Raïb, Lben, Klila, la crème, le beurre frais et le J'ben est largement répandue (Badis et al, 2004).

Le fromage occupe une place essentielle dans l'alimentation algérienne, apportant un équilibre nutritionnel grâce à sa richesse en lactose, lipides et protéines (Walther et al, 2008). Les bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans l'industrie laitière et la fermentation d'autres produits alimentaires, favorisant le développement d'arômes et de textures spécifiques tout en garantissant une sécurité alimentaire optimale (Tabak et Bensoltane, 2012). Utilisées depuis des générations dans la production d'aliments fermentés tels que les fromages, charcuteries, boissons et pain, ces bactéries non pathogènes se retrouvent dans différents environnements naturels (Badis et al, 2005). De plus, les bactériocines, des protéines produites par les bactéries lactiques, présentent une activité antibactérienne notable, notamment contre *Listeria monocytogenes* (Dalet, K 2000).

Chapitre I

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Etude bibliographique

I.1. Produits laitiers traditionnels :

Le lait occupe une place centrale dans la tradition africaine. C'est un aliment prestigieux, caractéristique des sociétés pastorales. Les femmes jouent un rôle clé dans la transmission des techniques liées aux produits laitiers, qu'il s'agisse de la traite, de la fermentation, de l'écémage ou du barattage. Le lait devient ainsi le symbole de la culture africaine, étant à l'origine de nombreux produits et de recettes culinaires variées. On le consomme sous différentes formes : lait frais, lait caillé, crème de beurre, huile de beurre, boissons lactées, bouillies, ou couscous... Cette tradition est profondément enracinée dans des régions spécifiques, entre des groupes sociaux et des cultures locales. Les produits laitiers deviennent donc un reflet d'identités distinctes. (Duteurtre G, 2009)

Les produits laitiers occupent une place centrale dans l'alimentation humaine dans les pays africains. En Algérie, divers produits laitiers sont fabriqués de manière traditionnelle dans le but de préserver le lait pour une utilisation future. Parmi les produits laitiers traditionnels algériens les plus connus sur le plan commercial, on trouve le Raïbe, le L'ben, le yaourt, le fromage et le beurre. (Benkerroum et Tamime, 2004).

Le taux de consommation des produits laitiers en Afrique n'a pas beaucoup changé au cours des vingt dernières années (OCDE-FAO, 2019). Il représente 8 % pour les produits laitiers frais et la poudre de lait écrémé, et seulement 4 % pour le beurre et le fromage. En revanche, dans les pays asiatiques, qui contribuent à la moitié de l'augmentation de la consommation mondiale de produits laitiers, la situation est différente. Outre la croissance démographique, trois facteurs principaux expliquent l'augmentation de la consommation dans ces pays (FAO, 2013) : i) l'augmentation du revenu moyen, ii) l'urbanisation croissante qui conduit à une occidentalisation des habitudes alimentaires, et iii) les progrès techniques qui facilitent la distribution des produits laitiers (méthodes d'emballage, chaînes logistiques, respect de la chaîne du froid, etc.). (Chatellier V, 2020).

La fermentation lactique est un processus par lequel des bactéries lactiques décomposent le glucose de manière incomplète en l'absence d'oxygène, produisant de l'acide lactique et libérant de l'énergie qui permet à ces bactéries de se multiplier. (Diouf, P. B., & Diouf, 2022)

Ce processus est largement utilisé dans l'industrie laitière pour la production de fromages et de yaourts. De plus, lorsque les cellules musculaires manquent d'oxygène, elles peuvent également recourir à la fermentation lactique pour obtenir de l'énergie. (Diouf, P. B., & Diouf, 2022).

I.2. Jben :

Le J'ben est l'une des variétés traditionnelles les plus populaires, et sa méthode de fabrication reste utilisée de nos jours. On observe une augmentation de sa consommation dans les zones steppiques, grâce à ses propriétés organoleptiques et nutritionnelles agréables, issues d'une microflore indigène qu'il est essentiel de comprendre. (Dahou et al., 2015)

I.2.1. Préparation de jben :

Des tests ont été menés pour préparer ce produit en utilisant du lait pasteurisé inoculé avec des cultures lactiques sélectionnées. La méthode de préparation comprend l'inoculation du lait pasteurisé avec un levain à un taux de 3%, l'ajout de présure après que le lait ait atteint une acidité de 20 à 25 degrés Dornic, le moulage du caillé à un pH compris entre 4,4 et 4,6, le démoulage du fromage une fois qu'il atteint une teneur en matière sèche de 22 à 30%, et enfin une phase de séchage pendant 24 heures à température ambiante. Pour le jben salé, le sel (1,5%) est ajouté par saupoudrage après le démoulage. (Hamama et al., 1995).

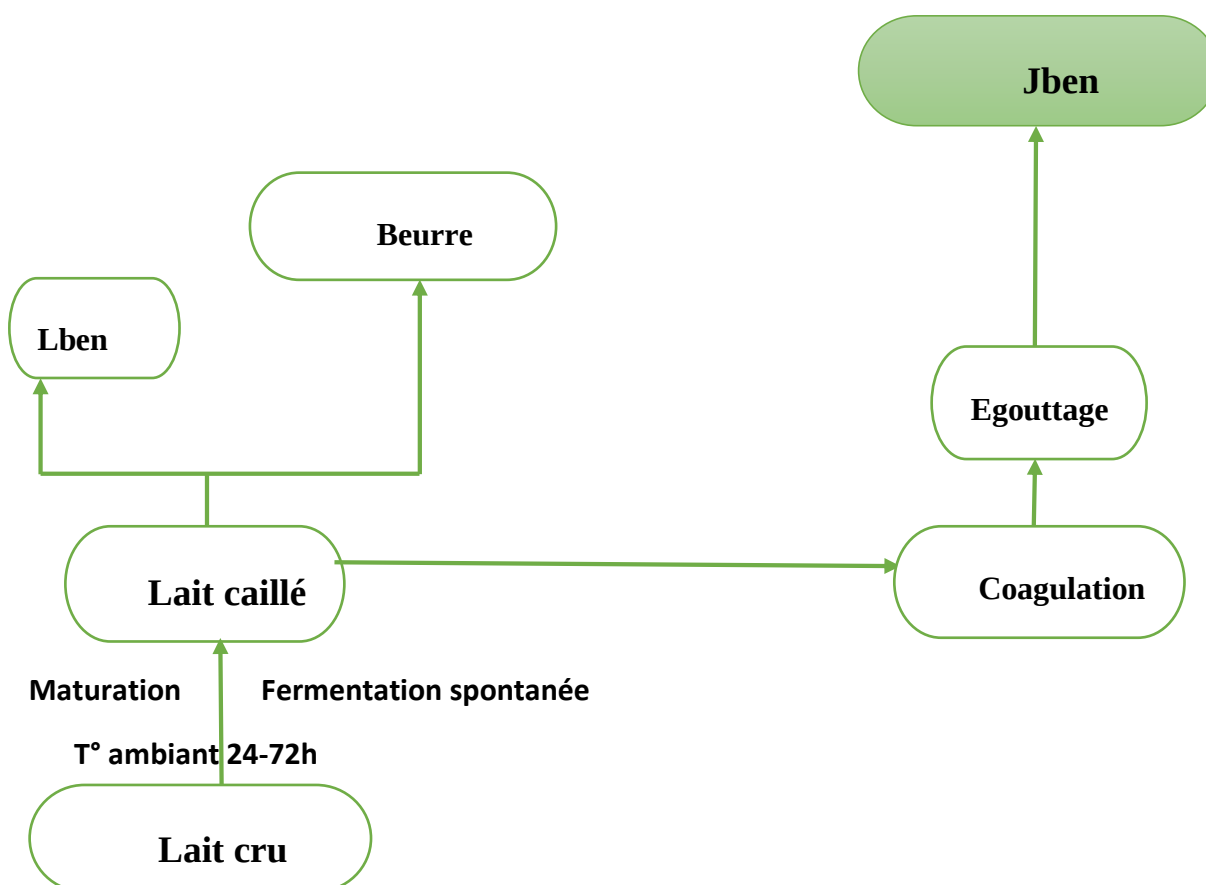


Figure 1:Schéma de la fabrication des produits laitiers traditionnels (Benkerroum et Tamime, 2004)

I.2.2. Caractéristiques physiques et chimiques du Jben :

Un grand nombre de ces fromages sont produits avec du lait cru dans de petites fromageries artisanales, en respectant des réglementations mises en place et surveillées par une appellation d'origine. La qualité microbienne des fromages fabriqués avec du lait de brebis cru est déterminée à la fois par la qualité de la matière première et par le processus de fabrication. Les caractéristiques microbiologiques du lait de brebis diffèrent de celles du lait de vache à plusieurs égards.

Le fromage frais « Jben » n'a pas de caractéristiques précises en raison des méthodes artisanales utilisées pour sa fabrication, qui reposent principalement sur le savoir-faire acquis par une longue expérience. (Salmeron et al., 2002)

La saveur particulière et les propriétés organoleptiques typiques des fromages « Jben » au lait cru sont associées à des caractéristiques physico-chimiques spécifiques du lait cru, liées à la race et à la nutrition des vaches laitières, au processus de fabrication du fromage traditionnel de base et à la microbiote naturelle. (Poznanski et al., 2004).

La variation dans la fabrication du fromage « Jben » conduit à une grande différence dans la composition chimique du produit. Les valeurs chimiques générales du fromage commercial sont indiquées en moyenne. Le pH (moins de 4,2) et l'acidité titrable (plus de 0,9%) sont les paramètres les moins variables dans le fromage « Jben ». Cependant, le contenu total en matières solides dans le « Jben » est le facteur le plus variable, car il dépend de la durée de drainage du caillé. Puisque donné que les lipides, le lactose et les protéines sont les principaux composants des matières solides dans le « Jben », ils sont directement influencés par les variations de ces dernières. (Benkerroum et Tamime 2004).

Jben est également fabriqué à partir de lait pasteurisé. Les caractéristiques finales du fromage traditionnel « Jben » varient et sont influencées par la méthode de préparation. La microflore du fromage est dominée par les LB (Mouna et al., 2005)

I.2.3. Microflore de Jben :

Les micro-organismes présents dans le lait et les produits laitiers en générale « Jben » ont joué un rôle fondamental dans sa transformation et sa conservation au fil du temps. Depuis des époques très anciennes, les laits fermentés « Jben » sont consommés par différentes cultures. Avec l'ajout de la présure, les bactéries naturelles du lait ouvrent la voie à la production d'une grande variété de fromages. « Jben » (Dahou et al., 2015).

La technique d'électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (PCR-DGGE) a été utilisée pour étudier la diversité des LB dans le fromage « Jben », où les cultures traditionnelles ont

principalement montré la présence de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Pediococcus pentosaceus*.

(Van Hoorde et al., 2008).

I.3. Les bactéries lactiques

Les BL sont constitués de différents groupes de bactéries ayant un métabolisme purement fermentatif. Trois types de métabolisme peuvent être observés : homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation sont de l'acide lactique), hétérofermentaire facultatif (production d'acide lactique seul ou associé à de l'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de CO₂). (Mozzi et al., 2015). Ces bactéries sont présentes dans des milieux riches en nutriments, où elles ont la capacité de coloniser différents produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les poissons, les végétaux, les céréales, les boissons, l'eau et le miel. Ils sont aussi visibles dans le processus d'ensilage, dans la flore buccale, intestinale et vaginale des êtres humains et des animaux. (Rokop et al., 2015).

I.3.1. Caractéristique général des bactéries lactiques:

Les organismes vivants, procaryotes, Gram positifs, hétérotrophes et chimio-organotrophes, sont appelés les BL. En général, elles ne sont pas mobiles, ne produisent jamais de spores et réagissent négativement à la catalase et à l'oxydase. Il s'agit d'organismes facultatifs anaérobies et micro-aérophiles. (Tailliez, 2001). Les bactéries lactiques, également connues sous le nom de bactéries de l'acide lactique, se distinguent par leur capacité à fermenter les glucides en générant de l'acide lactique.

Les BL sont des micro-organismes anaérobies quitolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. Leur métabolisme, ainsi que leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN, sont influencés par l'oxygène. Deux types d'oxydases à NADH sont présents chez les bactéries lactiques, ces enzymes permettent de réduire l'oxygène en H₂O₂ ou en H₂O. (Ammor et al., 2006).

Les besoins nutritionnels complexes des BL comprennent des acides aminés, des peptides, des sels, des vitamines, des acides gras et des glucides fermentescibles.

(Dellaglio et al., 1994).

I.3.2. Classification

L'homologie des séquences de l'ARN ribosomique (16S) a été introduite dans le Manuel de Bergey, cité par Amrouche (2003), pour la nouvelle classification des genres de BL. Les différents genres de BL sont les suivants :

Phylum B XIII: Firmicutes.

Classe III: Bacilli.

Ordre II: Lactobacillales.

Famille I: Lactobacillaceae.

Genre I: Lactobacillus.

Genre II: Pediococcus.

Famille III: Clostridiaceae.

Famille IV: Enterococaceae.

Genre I: Enterococaceae.

Genre I: Tetragenococcus.

Genre IV: Vagococcus.

Famille V: Leuconostocaceae.

Genre I: Leuconostoc.

Genre II: Oenococcus.

Famille VI: Streptococaceae.

Genre I: Streptococcus.

Genre II: Lactococcus.

Les critères moléculaires tels que la comparaison des séquences codant pour les ARN 16 S ribosomiques sont utilisés pour la classification, et les études basées sur ces critères moléculaires ont permis de classer les espèces de la manière suivante :

La composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'identifier le type d'espèces en fonction de la nature de la liaison peptidique.

En mesurant la composition de l'ADN par hybridation, on peut distinguer les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage de bases Guanine + Cytosine (GC) permet de rapprocher les genres streptococcus (34-46%), leuconostoc (36-43%), et pediococcus (34-42%). (Schleifer, 1986: Farrow et al, 1989). Selon le tableau 1 (Scardovi, 1986), le pourcentage de (G-C%) des espèces du genre lactobacillus est très variable et oscille entre 32 et 53% d'une espèce à l'autre. Toutefois, il est possible de regrouper les espèces des genres Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc ou Streptococcus dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50% dans la branche des Clostridium avec

Bacillus, et de les séparer de la branche des Actinomycétales avec un G-C % supérieur à 50%, y compris Propionobacterium et Bifidobacterium. (Stackebrandt et Teuber, 1988)

Tableau 1: les différents genres de bactéries lactiques

Genres	Cellules		Fermentation	ADN G-C (%)	Références
	Forme	Arrangements			
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46	SCHLEIFER, 1986
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaines	Hétérolactiques	36-43	FARROW et al., 1989
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34-42	SCHLEIFER, 1986
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaines	Homolactiques et Hétérolactiques	32-53	KANDLER et WEISS, 1986 a et b

Un arbre phylogénique représente les relations phylogénétiques entre les divers genres de bactéries lactiques (**figure 2**).

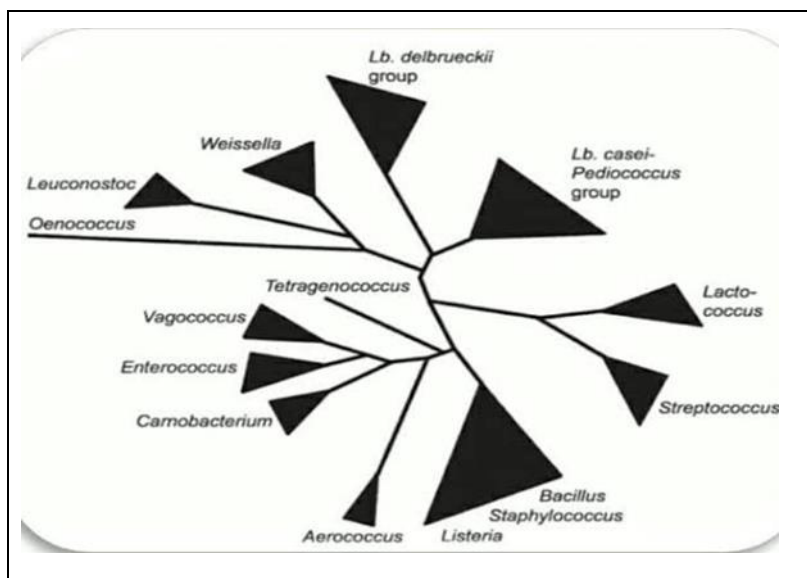


Figure 2:Arbre phylogénétique des bactéries et comparaison avec les genres Aerococcus, Listeria, Staphylococcus et Bacillus (Axelsson, 2004)

I.3.3. Habitat de lactobacillus:

La famille des bactéries lactiques est un groupe bactérien très répandu dans la nature, se retrouvant dans des environnements variés tels que les produits laitiers fermentés, les viandes, les végétaux, les voies gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux, ainsi que dans le sol et l'eau (Liu, W et al., 2014).

Au fil du temps, les bactéries lactiques se sont adaptées à différents habitats, passant de leur présence initiale dans le sol et sur les plantes à l'intestin des mammifères. L'intestin des mammifères abrite en effet plus de 100 billions de micro-organismes, communément appelés microbiote (Hooper L., 2010).

Le microbiote joue un rôle crucial dans la santé en favorisant le métabolisme, la digestion et le renforcement du système immunitaire. Le péristaltisme intestinal favorise l'adhésion des bactéries lactiques aux cellules intestinales, tandis que les mucines les protègent et les retiennent à la surface des cellules épithéliales (Corfield et al., 2000).

Par exemple, les propriétés antimicrobiennes des substances produites par certaines espèces de Lactobacillus et de Bifidobacterium ont été confirmées contre les bactéries entéropathogènes responsables de diarrhées (Servin, A. L. 2004).

I.3.4. Méthodes d'étude et d'identification des bactéries lactiques

La taxonomie traditionnelle des BL repose toujours sur les propriétés morphologiques phénotypiques, biochimiques et physiologiques. On a étendu cette identification en intégrant des

indicateurs chimio-taxonomiques (acides gras cellulaires), en analysant les protéines totales de la cellule et d'autres caractéristiques de la cellule. (Temmerman et al., 2003). Toutefois, une identification précise dépend maintenant aussi de l'information génétique. Pour cette raison, les techniques génétiques comme le séquençage de l'ADN 16S, le ribotypage, l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD), la rep-PCR et d'autres sont indispensables pour la classification contemporaine des bactéries lactiques (Temmerman et al., 2003, 2004).

Les principales techniques employées pour la classification et l'identification des bactéries lactiques sont présentées ci-dessous.

I.3.5. Méthodes phénotypiques:

Pendant des décennies, la différenciation entre les genres de bactéries lactiques reposait sur les caractéristiques phénotypiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques. Sous le microscope, les bactéries lactiques apparaissent généralement sous forme de coques ou de bacilles à Gram positif. Cependant, la morphologie cellulaire peut souvent être instable et similaire entre plusieurs genres. Par exemple, les lactobacilles et certains genres proches tels que *Carnobacterium* et *Weissella* peuvent présenter différentes formes, allant de bacilles longs ou incurvés à des formes de corynébactéries ou de coccobacilles. Pour distinguer ces genres proches, il a été nécessaire de se baser sur d'autres caractéristiques, telles que l'incapacité de *Carnobacterium* à utiliser l'acétate et la structure de la paroi cellulaire de *Weissella*, qui diffère de celle des lactobacilles hétérofermentaires. (Cocuret et al., 2003).

Les Bl sont caractérisés physiologiquement en fonction de leur mode de respiration, de leur croissance à différentes températures et de leurs valeurs de pH et de concentrations de NaCl, ce qui permet de distinguer les genres. (Temmerman et al., 2004).

Le type fermentaire (homo / hétérofermentaire) des bactéries lactiques est étudié, ainsi que leur aptitude à utiliser les glucides ou l'arginine, ainsi que leur résistance aux antibiotiques. (Ismaili et al., 2016). L'évolution des micro-méthodes biochimiques a été importante, avec la mise sur le marché de systèmes d'identification qui relient une galerie miniaturisée de tests biochimiques à des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus. (Roissart et Luquet, 1994)

I.3.6. Méthodes génotypiques:

Au cours des dix dernières années, l'émergence de nouvelles méthodes indépendantes de la culture a connu une croissance significative, offrant une alternative puissante à l'identification des microorganismes à l'aide de méthodes culturelles. (Amann et al., 1995). L'un des principaux

avantages de ces techniques est qu'elles permettent d'étudier la variété de plusieurs échantillons en même temps en supprimant les préjugés liés à la culture. L'analyse de l'ADN permet une différenciation plus précise des micro-organismes à divers niveaux, du genre à la souche, selon les méthodes employées.

Lors de l'analyse de communautés microbiennes, les gènes cibles fréquemment employés sont ceux de l'opéron ribosomal, notamment l'ARNr 16S chez les bactéries. L'emploi. Grâce à des régions Internal Transcribed Spacers (ITS), il est possible de mieux séparer les levures et certaines bactéries d'un écosystème. (Jany et Barbier, 2008). Les gènes qui codent les ARNr sont présents partout et ont en même temps des régions conservées (utilisées comme cibles pour des amorces spécifiques ou universelles) et variables, ce qui permet d'identifier spécifiquement des espèces et de déterminer la diversité globale d'un écosystème en analysant les séquences d'ADNr 16S.

Il existe de nombreuses approches utilisant ces marqueurs, qui sont généralement associées à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR n'est pas utilisée pour d'autres techniques telles que l'association et la réassociation d'AND, l'hybridation AND-AND ou ARNm-AND. (Cocolin et al., 2013). Ces méthodes offrent une grande certitude quant à l'espèce et à la souche à laquelle la bactérie peut être attribuée, si les conditions de l'expérience et les amorces sont correctement ajustées. (Felis et Dellaglio, 2007,). La **figure 13** illustre les différentes méthodes moléculaires utilisées pour l'écologie microbienne des aliments.

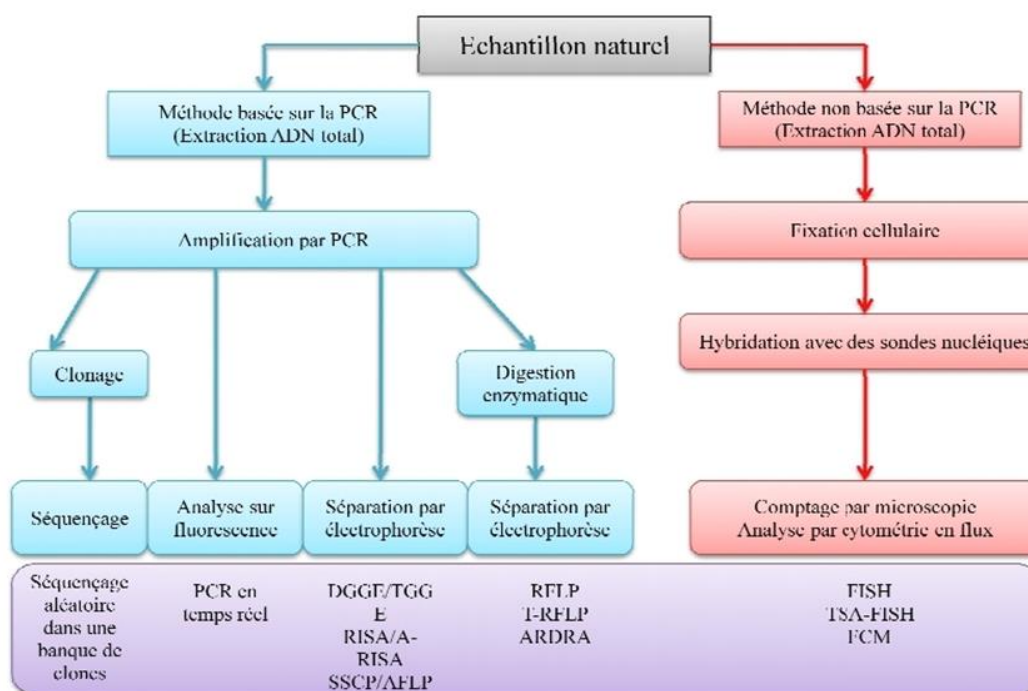


Figure 3: Différentes approches moléculaires appliquées à l'écologie microbiennes des aliments (Abdelkader, A.2015)

I.4. *Listeria monocytogenes* :

Le germe *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène psychrotrophe, se présentant sous forme de courts bacilles à Gram positif, non sporulés et non capsulés. Elle est aéroanaérobie facultative, catalase positive et oxydase négative, avec des dimensions variant de 0,5 à 2 µm en longueur et 0,5 µm en largeur. C'est un microorganisme intracellulaire facultatif, capable de se multiplier dans une plage de températures allant de 1 à 45°C, bien que son activité soit modérément réduite à 0°C. Elle tolère des pH allant de 4,4 à 9,6 et des concentrations en sel jusqu'à 10% de NaCl. Cette bactérie se trouve chez les humains, les animaux, ainsi que dans les aliments et les installations de transformation alimentaire, notamment les abattoirs. En tant qu'agent pathogène humain, elle suscite de sérieuses inquiétudes en raison de sa capacité à provoquer des maladies graves, parfois mortelles, et de sa large distribution dans l'environnement et les produits alimentaires. (Messak et Hadri, 2023).

I.4.1. Historique :

En mai 1924, une épidémie a touché les lapins de laboratoire du département de pathologie de l'université de Cambridge (Murray, 1926).

Caractérisée par une perte de poids et une mort subite. Les autopsies ont révélé des nécroses du foie et une augmentation du nombre de monocytes. Les chercheurs dirigés par EGD Murray ont attribué cette maladie à une bactérie Gram positive isolée des lapins malades. Initialement appelée *Bacterium monocytogenes* en raison des symptômes observés, cette bactérie a été renommée *Listerella monocytogenes* en 1927 lorsque J. Harvey Pirie a découvert une souche similaire responsable de la mort de gerbilles en Afrique du Sud.

Face à la similitude des souches de Murray et Pirie, le nom *Listerella monocytogenes* a été préféré. Cependant, étant donné que le terme "listerellose" était déjà utilisé pour décrire certaines pathologies, Pirie a proposé le nom *Listeria monocytogenes* en 1940, qui a été finalement adopté. Pendant de nombreuses années, les listérioses ont été principalement considérées comme des maladies animales, bien que des cas sporadiques et parfois graves aient été signalés chez l'homme. L'intérêt pour *L. monocytogenes* a considérablement augmenté en 1983 (Schlech et al., 1983), lorsque sa transmission par voie alimentaire a été prouvée. Depuis lors, *L. monocytogenes* est l'objet de nombreuses études et d'une surveillance accrues.

I.4.2. Habitat :

Listeria monocytogenes est présente dans de multiples habitats environnementaux, tels que les eaux usées, les produits alimentaires, et les sites de transformation alimentaire. Des recherches

indiquent que cette bactérie est particulièrement répandue dans les aliments (EL KHADDAR.2021).

I.4.2.1. L.monocytogenes dans l'eau :

La présence de *Listeria monocytogenes* est rarement détectée dans l'eau de mer, les nappes phréatiques et les sources non contaminées. En revanche, cette bactérie est fréquemment observée dans les eaux de rivière, les baies, les eaux usées et les rejets industriels et agricoles. Plusieurs études ont corroboré ces constatations et suggéré que l'incidence de *L. monocytogenes* est corrélée à l'activité humaine et animale. En effet, les eaux contaminées et les résidus organiques offrent un environnement propice à la croissance de cette bactérie, contrairement aux eaux non polluées (EL KHADDAR.2021).

I.4.2.2. L.monocytogenes dans les usines de transformation des aliments :

Dans les installations de transformation des aliments, *Listeria monocytogenes* présente une propension à se fixer aux surfaces des équipements et des surfaces de travail, favorisant ainsi la formation de biofilms qui résistent efficacement aux conditions défavorables. Des recherches ont identifié la présence fréquente de *L. monocytogenes* dans les usines produisant du fromage, de la dinde et de la viande, avec une prédominance des sérotypes 1/2a, 1/2b et 1/2c. Ces sérotypes, particulièrement le 1/2c, démontrent une affinité notable pour les surfaces en acier inoxydable utilisées dans ces installations (EL KHADDAR.2021).

I.4.3. Caractéristiques biologiques :

I.4.3.1. Classification :

Listeria fait partie de la famille des corynébactéries depuis longtemps. Plusieurs études de classification numérique ont démontré que *Listeria* était en réalité plus proche des *Lactobacilles* ou des *Streptocoques* que des bactéries corynéformes.

D'après le Manuel de Bergey (2001):

Domain XIII Bacteria

Phylum III Firmicutes

Classe III Bacilli

Ordre I Bacillales

Famille IV Listeriaceae

Genre *Listeria*

I.4.3.2. Morphologie :

Toutes les espèces du genre *Listeria* ont une morphologie caractéristique, se présentant sous forme de bâtonnets réguliers mesurant entre 0,4 et 0,5 μm de diamètre et entre 1 et 2 μm de longueur, avec des extrémités arrondies. Elles peuvent être observées individuellement ou en courtes chaînes, parfois disposées en forme de V, de Y ou en palissades. La motilité de *Listeria* est assurée par quelques flagelles pétritiches, visibles surtout lorsqu'elles sont cultivées entre 20 et 25 °C, tandis qu'elles deviennent peu mobiles voire immobiles à 37 °C. Gram positives et uniformes, ces bactéries ne forment pas de spores et ne possèdent généralement pas de capsule. Cependant, Smith et Metzger ont rapporté la présence d'une capsule chez l'espèce *Listeria monocytogenes* dans des conditions spécifiques, grâce à l'avancement des techniques de microscopie électronique (EL KHADDAR.2021).

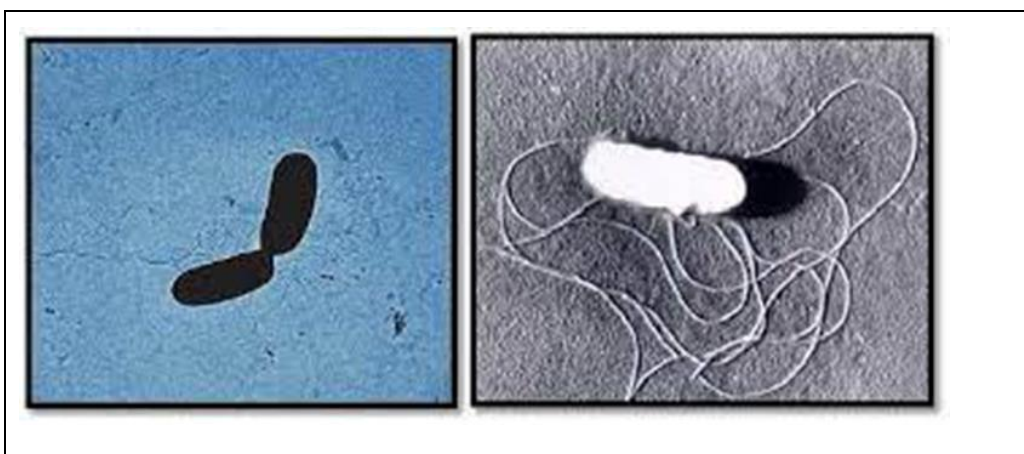


Figure 4: Micrographie de *L.monocytogenes* (National Institutes of Health, United States Département of Health and Human Services, February 2004) (Herro, 2005)

I.4.4. Les caractères biochimiques et cultureux:

I.4.4.1. Les caractères cultureux :

Listeria est une bactérie aérobie facultative, micro aérophile. Elle se développe typiquement sur les milieux bactériologiques couramment utilisés. Sur une gélose nutritive, ses colonies, après 24 heures d'incubation, sont généralement lisses, de couleur gris bleuté, translucides et légèrement surélevées, avec une texture de

Surface fine et une bordure intacte. Au bout de 5 à 10 jours, les colonies se séparent et leur diamètre augmente, atteignant parfois 5 mm ou plus.

Certaines espèces présentent une hémolyse bêta sur gélose au sang de cheval à 5%. En culture sur plaque, *Listeria* émet une odeur acide due à la production d'acides carboxyliques, d'hydroxydes et d'alcools. En bouillon, le milieu devient généralement trouble après 8 à 24 heures d'incubation à 37°.

Les espèces de *Listeria* se développent préférentiellement dans des environnements à faible teneur en oxygène, avec une température optimale de 30 à 37°C, et un pH compris entre 4,5 et 9,2, mais elles prospèrent idéalement à un pH de 7. Ce sont des bactéries halotolérantes, capables de croître dans des milieux contenant jusqu'à 20% de NaCl. De plus, elles sont parmi les agents pathogènes d'origine alimentaire capables de se développer à une activité de l'eau inférieure à 0,93. (El khaddar F. 2021).

I.4.4.2. Les caractères biochimiques:

L. monocytogenes est caractérisé biochimiquement par les méthodes d'identification bactérienne traditionnelles : catalase+, oxydase-, β -hémolyse sur gélose sanguine, D-xylose-, D-mannitol-, L-rhamnose+, Citrate-, -méthyl-D-mannoside+. La bactérie ne possède pas de réductase de nitrate, elle fermente le glucose sans générer de gaz, elle hydrolyse l'esculine et elle ne produit ni d'indole ni de H₂S. Elle est protéolytique (gélatine-) et non protéolytique (uréase-), phosphatase alcaline+. La fermentation tardive ou négative de l'arabinose, du lactose, du mélézitose, du saccharose et de la dextrine est observée. On ne fermente pas la xylose, le raffinose, l'inositol, le dulcitol, le mannitol et l'adonitol. En présence de rouge de méthyle et au test Voges Proskauer, *Listeria* présente des résultats positifs. (Seeliger, 1986)

I.4.5. Pouvoir pathogène et implication dans la contamination alimentaire :

L. monocytogenes est responsable de plusieurs petites épidémies alimentaires, et bien que les cas soient relativement rares, l'infection reste alarmante en raison de son taux de mortalité élevé.

Aux États-Unis, entre 2009 et 2011, l'incidence annuelle moyenne était de 0,29 cas pour 100 000 habitants, avec une létalité de 21%. Ce schéma se répète dans le monde entier, avec des incidences annuelles modestes mais des taux de mortalité élevés. Par exemple, en Australie en 2011, l'incidence était de 0,3 cas pour 100 000 habitants avec une létalité de 21%, et en Nouvelle-Zélande en 2010, l'incidence était de 0,5 cas pour 100 000 habitants avec 3,8% de décès. En 2011, dans l'Union européenne, l'incidence était de 0,32 cas pour 100 000 habitants avec 12,7% de décès.

Les listérioses humaines, causées par *L. monocytogenes*, sont particulièrement dangereuses pour les femmes en âge de procréer, les nourrissons et les personnes âgées. Les femmes enceintes, les nouveau-nés et les adultes immunodéprimés présentent le plus haut risque, mais l'infection peut également toucher des individus sans conditions médicales préexistantes.

Chez les femmes enceintes, l'infection peut entraîner des complications graves telles que la perte fœtale, la mortinaissance, l'accouchement prématuré ou une infection néonatale.

La principale voie de transmission de *L. monocytogenes* est la consommation d'aliments contaminés. Avec des taux de mortalité au moins dix fois supérieurs à ceux d'autres infections alimentaires, la lutte contre ce micro-organisme est une préoccupation majeure pour les producteurs alimentaires. (Ghita, B. T. 2020).

I.4.6. *Listeria monocytogenes* dans le Lait et les produits laitiers :

Les taux d'infection par *L. monocytogenes* et les risques associés dans l'industrie laitière (Aygün et Pehlivanlar, 2006). Varient selon le type de production. Les conditions de fabrication, telles que l'humidité ambiante, peuvent favoriser la survie et la propagation de *L. monocytogenes*, ce qui rend cette industrie particulièrement vulnérable.

Cependant, il est important de noter que le lait cru possède ses propres mécanismes de défense, tels que le système lactopéroxydase antimicrobien, qui aide à contrer les envahisseurs microbiens. *L. monocytogenes* peut être retrouvée dans une gamme de fromages, notamment les fromages à pâte molle, semi-molle, persillée, pressée ou fraîche (Millet et al., 2006). Le comportement de *L. monocytogenes* varie considérablement en fonction du type de fromage (Larpen, 1997).

I.5. Les bactériocines des bactéries lactiques

I.5.1. Définition et caractéristiques principales

Au fil du temps, diverses définitions des bactériocines ont été proposées. Cependant, la définition la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988), qui décrit les bactériocines comme des protéines ou des complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

Les bactériocines constituent une vaste classe de substances antagonistes qui varient considérablement en termes de poids moléculaire, de propriétés biochimiques, de spectre d'action et de mode d'action (Xie et al., 2011). Les bactériocines sont des composés protéiques qui inhibent principalement les espèces étroitement liées. Certaines bactériocines ont démontré la capacité d'inhiber les actions de genres non apparentés tels que les Clostridies, les *Listeria*, les bactéries entéropathogènes et les bactéries à Gram négatif. (Anas, M et al., 2008).

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines antimicrobiennes synthétisés au niveau des ribosomes. (Gálvez et al., 2007). Les bactériocines sont un groupe hétérogène de protéines antibactériennes qui varient en termes de spectre d'activité, de mode d'action, de poids moléculaire, d'origine génétique et de propriétés biochimiques. (Omar, N et al., 2006)

I.5.2. Nomenclature :

Généralement, les bactériocines sont nommées selon le genre ou l'espèce de la souche qui les produit. Par exemple, la plantaricine produite par *Lactobacillus. Plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009). Les bactéries à Gram positif, en particulier les bactéries lactiques (LB), sont de plus en plus étudiées pour leur production d'activité inhibitrice, à savoir les bactériocines.

Cela a permis de comprendre en détail de nombreuses caractéristiques uniques de ce groupe étonnamment hétérogène de molécules antimicrobiennes, un groupe apparemment uni uniquement par leur composition protéique et leur capacité à tuer des bactéries généralement proches de la bactérie productrice. L'intérêt croissant pour les bactéries lactiques productrices de bactériocines est en grande partie motivé par la reconnaissance de leur potentiel pratique soit pour la conservation des aliments, soit comme probiotiques. (Henget al., 2007)

I.5.3. Nature :

Les bactériocines des bactéries lactiques se composent généralement de protéines ou de complexes protéiques, avec une longueur typique de 30 à 60 acides aminés. Elles peuvent être simples ou associées à des lipides ou des glucides. Certaines contiennent des acides aminés inhabituels comme la lanthionine et la B-méthylalanine, (Ammor et al., 2006).

I.5.4. Caractéristiques:

Les bactériocines des bactéries lactiques montrent des similitudes avec certains peptides antimicrobiens des eucaryotes. (Riley, 2009). Elles sont typiquement de petite taille, cationiques (avec un excès de résidus lysyl et arginyl), amphiphiles et thermostables.

Leur poids moléculaire est relativement bas (2-6 kDa), ce qui facilite leur accès aux cellules cibles et leur capacité à perturber les membranes en se liant à des récepteurs de surface. (Anthony et al., 2009). Les bactériocines, produites par la plupart des bactéries lactiques, se distinguent des antibiotiques car elles sont synthétisées au niveau du ribosome et ont un spectre d'action relativement étroit, contrairement aux antibiotiques qui sont généralement des métabolites secondaires et ont un spectre d'action plus large. (Ghrai et al., 2008)

I.5.5. Propriétés des bactériocines:

Certaines caractéristiques des bactériocines produites par les bactéries lactiques soutiennent leur sélection en tant que bioconservateurs (Thakur et Roy, 2009) :

- Généralement résistantes à la chaleur et aux variations de pH.
- Dotées d'un large spectre d'activité.

- Généralement bactéricides en agissant sur la membrane cytoplasmique.
- Leurs gènes déterminants sont codés par des plasmides.
- Sensibles aux protéases et digérées dans le tractus intestinal.
- Reconnues comme étant généralement sans danger (GRAS).
- Inactives et non nocives pour les cellules eucaryotes.

I.5.6. Classification:

La classification récente des bactériocines, telle qu'exposée dans le tableau 1, est une adaptation de celle proposée initialement par Klaenhammer (1993), élaborée par Cotter et al. (2005).

Selon cette classification, les bactériocines des bactéries lactiques sont catégorisées en deux classes principales en fonction de la présence ou de l'absence d'acides aminés soufrés inhabituels, tels que la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydroalanine et la déhydrobutyrine, résultant de modifications post-traductionnelles. Les bactériocines contenant ces acides aminés appartiennent à la classe des lantibiotiques.

Les lantibiotiques sont des peptides thermostables de taille inférieure à 5 kDa, se divisant en deux types : ceux composés d'un seul peptide, comme la nisine, et ceux nécessitant deux peptides pour leur activité, comme la lacticine 3147.

La deuxième classe comprend des peptides thermostables de taille inférieure à 10 kDa, contenant un (tel que la pédiocine PA1) ou deux peptides (comme la lactacine F).

Certains de ces peptides présentent une structure cyclique, par exemple l'entéroisine AS 48. Ils sont répartis en quatre sous-classes : a, b, c et d, selon (Dortu et Thonart (2009)). Conformément à Cotter et al. (2005), les bactériolysines ne sont pas incluses dans la catégorie des bactériocines ne sont pas incluses dans la catégorie des bactériocines.

I.5.7. Mode d'action

Différentes protéines sont impliquées dans la production et la régulation des bactériocines. Celles-ci sont produites sous forme de prépeptides non biologiquement actifs qui subissent des modifications post-traductionnelles pour devenir des peptides actifs (Dortu et Thonart, 2009).

Les lantibiotiques peuvent être divisés sur la base de leur structure et de leur mode d'action. En général, les lantibiotiques cationiques amphiphiles allongés (comme la nisine) sont actifs par la formation de pores, ce qui conduit à la dissipation du potentiel membranaire et à l'efflux de petits métabolites des cellules sensibles. (Cotter, et al. (2005)).

L'ampleur du mécanisme d'action n'est pas entièrement comprise, mais le lipide II (un précurseur des peptidoglycanes) est une lipoprotéine qui se fixe à la surface externe de la membrane cellulaire et interagit avec le lantibiotique pour l'empêcher de former des pores. (Dortu et Thonart, 2009)

Les bactériolysines, en revanche, ont un mode d'action entièrement différent, basé sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes. (Cotter et al., 2005).

Tableau 2 : classification des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et al., 2005)

Classe	I Lantibiotiques	II Bactériocines non modifiées	BactériolysinesProtéines Lytiques nonconsidéréescomme bactériocines
Description et sous-classes	Renferme les lantibiotiques à un et deux Peptides 11 sous- classes décrites	Classe hétérogène formée de petits peptides -sous-classe a: bactériocines semblables à la pédiocine (pediocin- like) - sous-classe b : bactériocines à deux peptides - sous-classe c : bactériocines cycliques. - sous-classe d : bactériocines à un seul peptide linéaire autres que la pédiocine	Grosses protéines thermolabiles généralement des hydrolases de muréine.
Exemples	-à un seul peptide: Nisine, Lacticine 481,Mersacidine -à deux peptides: Cytolysine, Lacticine3147	Pédiocine PA1, Leucocine A Lactacine F Enterocine AS48, Reutéline 6 Lactococcine A, Divergicine A	Lysostaphine, Enterolysine A

Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes:

II.1.1. Objectif de l'étude :

L'objectif de notre étude est d'isoler des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir des produits laitiers (jben) et d'analyser leur interaction avec des souches bactériennes pathogènes. Nous cherchons à démontrer le rôle de biopréservation de ces bactéries lactiques dans le jben en éliminant les bactéries nuisibles telles que *Listeria monocytogenes*, car ce produit est une denrée périssable et constitue un milieu favorable à la croissance de la flore contaminante.

II.1.2. Échantillonnage :

L'échantillon de jben traditionnelle a été acheté du magasin qui vend des produits laitiers et fromages traditionnels à M'Sila centre, et transporté au laboratoire dans une flacon d'analyse stérile à 4 °C, jusqu'au laboratoire. Les analyses doivent être effectuées immédiatement; sinon, l'échantillon doit être conservé dans un réfrigérateur à 4 °C.

II.1.3. Analyse microbiologique :

II.1.3.1. Dilution :

Dans de nombreux protocoles, la préparation de la solution est une étape de prétraitement pour mélanger deux liquides ou plus dans une certaine proportion. La dilution d'un échantillon ou d'un réactif chimique est un cas particulier de mélange ou de préparation de solution où seuls deux types différents de liquides, dont l'un est une solution tampon, sont mélangés dans une proportion spécifique correspondant au facteur de concentration souhaité (Mitra, et al 2012).

II.1.3.1.1 Préparation des dilutions décimales:

Les diverses dilutions sont effectuées en utilisant la solution mère comme base. C'est mettre série de dilution (10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-7}), chacun tube trouve 9ml de l'eau physiologie. On prend 1ml de tube (10^{-1}) et on met dans le tube (10^{-2}) et mélange la bien pour obtenir une solution homogène. Donc on a préparé séries de dilution (10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-7}). Il est recommandé de refaire les dilutions décimales successives pour réduire la charge bactérienne.

II.1.3.2. Isolement :**➤ Dans MRS solide**

L'ensemencement en profondeur a été réalisé à partir des dilutions décimales : 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} . Transférer stérilement 1 ml des solutions des dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles, numérotées et préparées à cet usage. Chaque dilution a été ensemencée en profondeur dans des milieux de culture gélosés MRS répartis en trois boîtes de Pétri. Ensuite, verser 15 ml de milieu gélosé MRS. Homogénéiser parfaitement le contenu en effectuant des mouvements en forme de huit. Laisser solidifier le milieu de culture et incubé verticalement les boîtes, couvercles vers le haut, à une température de 37°C pendant 24 à 72 heures.

NB : l'étape de Dénombrement des bactéries lactique on faire après L'ensemencement dans MRS solide

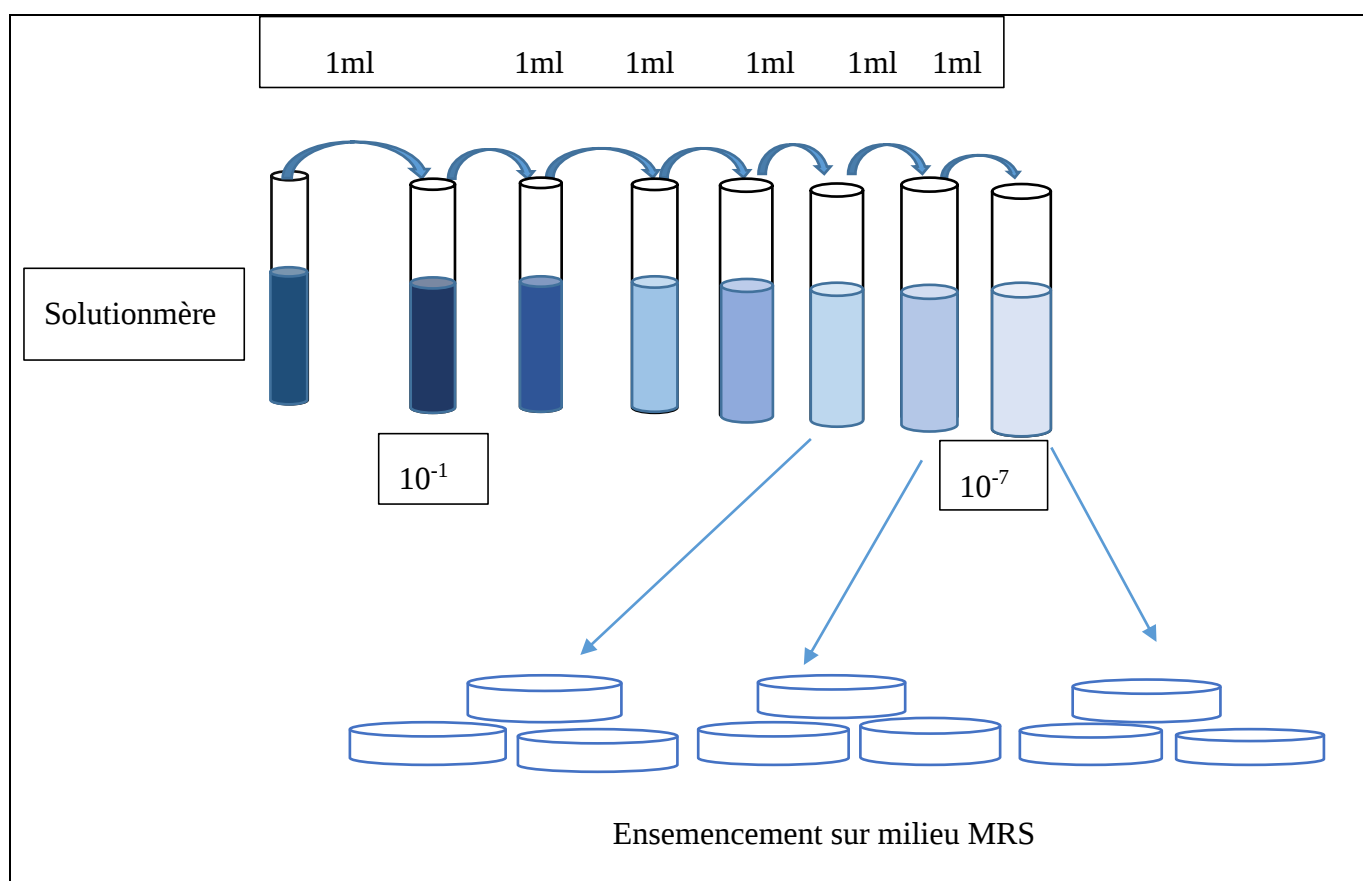


Figure 5: préparation des séries de dilution de jben pour isolement des bactéries lactiques

➤ Dans MRS liquide :

Après l'incubation boîtes de Pétri et l'observation des colonies bactérienne Le dénombrement sur milieu liquide a été effectué à partir des dilutions décimales suivantes: 10-5, 10-6 et 10-7 et. Chaque trois boîtes de Pétri de chaque dilution a été transféré les colonies bactériennes par l'anse de platine dans 10 tubes contenant le bouillon MRS. Incuber les tubes à température 37°C pendant 24h à 72 heure.

II.1.3.3. Dénombrement des bactéries lactique :

Après l'incubation, les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies ont été choisies pour le dénombrement en utilisant la formule suivante :

$$N = \sum c / (n1 + n2) dv$$

n1 : est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus faible.

n2 : est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus élevée.

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies.

d : est la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

V : le volume de suspension totalétalée en ml

(J. O. R.A,1998).

II.1.3.4. Purification :

Les souches sont purifiées en les ensemencant en stries sur des boîtes de Pétri remplies de milieux MRS (solides). Les boîtes sont donc placées à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. On répète cette opération jusqu'à ce que les colonies soient pures (ZAROOUR et al, 2013).

II.1.4. Analyse préliminaire des isolats :**II.1.4.1. Détermination des isolats :**

On a identifié les isolats de bactéries lactiques en deux étapes au stade du genre. La première étape implique d'effectuer des tests sur tous les isolats en utilisant la coloration de Gram et la synthèse de catalase. La seconde se base sur la morphologie (macroscopique et microscopique) et le type de fermentation. Au stade de l'espèce, on identifie les isolats représentatifs de la flore

dominante en se référant aux critères d'identification rapportés par plusieurs auteurs. (Badis et al., 2005)

II.1.4.2. Examen macroscopique :

➤ Préparation de la solution mère :

La première dilution préparée à partir d'un produit solide est la solution mère. Il faut mélanger 1g de Jben avec 9ml d'eau physiologique afin d'obtenir une solution homogène. Ainsi, nous avons préparé la solution mère.

➤ Repiquage :

Après avoir incubé les bactéries, on choisit des échantillons bien développés et sains de chaque bactérie pour la sous-culture. Cette procédure consiste à enlever les taches des colonies bactériennes en utilisant une boucle stérile et à les mélanger avec 9 ml de milieu liquide MRS dans un tube. Après agitation, la solution est transférée dans une nouvelle. La sous-culture est incubée à une température de 37 °C pendant une durée de 24 heures (Guiraud, 1980).

➤ Observation macroscopique :

La présente étude repose sur l'analyse visuelle des troubles sur le milieu de culture (MRS Liquide).

II.1.4.3. Examen microscopique:

Il est possible de déterminer certains traits morphologiques et organisationnels des bactéries grâce à leur observation

➤ Coloration de Gram de bactérie:

Il s'agit de la coloration standard en bactériologie. Elle se fait de la manière suivante: On applique du violet de gentiane sur une lame fixée à la chaleur ou à l'alcool. Après une minute, le colorant est retiré, puis on recouvre la lame de lugol pendant une minute, puis on le rejette. Ensuite, on procède à une décoloration à l'alcool, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool varie en fonction de l'épaisseur du frottis.

Dans la réalité, la durée de décoloration est adéquate lorsque la partie inférieure de la lame inclinée devient transparente, et la décoloration est arrêtée par un nouveau lavage à l'eau. Ensuite, on applique de la fuchsine diluée sur la lame pendant 30 secondes à 1 minute, puis on la lave à l'eau et on la sèche entre deux feuilles de papier filtre. Ensuite, on la fait chauffer et on l'examine à l'immersion. Il est nécessaire de donner une couleur violette aux bactéries à Gram positif et rose aux bactéries à Gram négatif. (Lanotte et al., 2016).

➤ **Observation microscopique**

En général, on effectue une observation microscopique aux différents grossissements (40X et 100X) pour évaluer la structure morphologique des colonies, leur forme, leur taille, le type de Gram et leur mode d'association (Soualah et al.2021)

➤ **Tests biochimiques:**

▪ **Teste catalase:**

La catalase est une substance chimique qui se trouve dans la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle réduit la quantité d'eau oxygénée (H₂O₂) obtenue par la respiration. Enrichie en eau et en oxygène qui s'échappe (Marchal et al., 1982).

On effectue le test de catalase en respectant le protocole suivant : En utilisant une pipette pasteur, on dépose une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes au milieu d'une lame propre et dégraissée. En utilisant une pipette boutonnée, on dépose un prélèvement provenant d'une culture pure de 18 heures sur l'eau oxygénée (Marchal et al., 1982). La présence de catalase est signalée par le dégagement des bulles de gaz. Si les bulles de gaz ne se dégagent pas, cela signifie qu'il n'y a pas de catalase.

II.1.4.4. Etude biochimiques:

➤ **Type de fermentaire :**

L'essai a été réalisé en introduisant les souches dans le bouillon MRS glucosé contenant la cloche de Durham, puis en les incubant à une température de 37°C pendant 24 à 48 heures. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham est un signe de développement d'une bactérie hétérofermentaire, qui n'existe pas chez les bactéries homofermentaires (Chrifi, 2019).

II.1.5. L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre les agents pathogènes d'origine:

II.1.5.1. Préparation de souche pathogène à tester :

Dans cette étude, on a utilisé une souche pathogène à gram positif fournie par le laboratoire d'université : *Listeria monocytogenes*. Il est nécessaire d'effectuer les tests antibactériens sur les cultures jeunes (de 18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle.

II.1.6. Test d'interaction entre les bactéries lactiques et *Listeria monocytogene* :

La recherche de la production éventuelle de substances inhibitrices par les bactéries isolées est effectuée selon deux méthodes :

II.1.6.1. Méthode directe (par touches):

D'après **Fleming et al (1975)**, il est nécessaire de cultiver les deux souches dans le même milieu en utilisant une double couche. Sur du MRS solide tamponné et à partir de souches de bactéries lactiques jeunes. (Un élément spécifique de la souche à identifier en phase de croissance exponentielle, Cela a été incubé à 37°C pendant 24 heures. On a versé 1 ml de bactéries pathogènes *Listeria monocytogene* dans 9 ml de MH solide.) La première gélose a été versée par-dessus en utilisant la méthode de la double couche. Une fois que le milieu est solidifié, les boîtes de Pétri sont incubées à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. L'analyse des résultats implique de voir si les souches ensemencées en touche présentent un halo clair et de mesurer leurs dimensions.

II.1.6.2. Méthode indirecte (par puits) :

Selon Barefoot et Kaenhammer (1983) On repique les bactéries lactiques dans du liquide MRS et on les incube pendant 24 heures à une température de 37°C. et après on fait une centrifugation à 6000 tr/15 min, puis le surnageant est récupéré.

Une pipette pasteur est utilisée pour creuser des puits de 6 mm de diamètre sur une gélose de Plate Count Agar (PCA) inoculée par la souche indicatrice (*Listeria monocytogene*). Les puits sont remplis avec 50 µL de surnageant. On laisse les boîtes de Pétrie pendant 2 heures à une température ambiante, afin de favoriser la diffusion efficace de la substance antibactérienne (Doumandji et al., 2010). Après une incubation de 24 heures à une température de 37°C, on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition en mm.

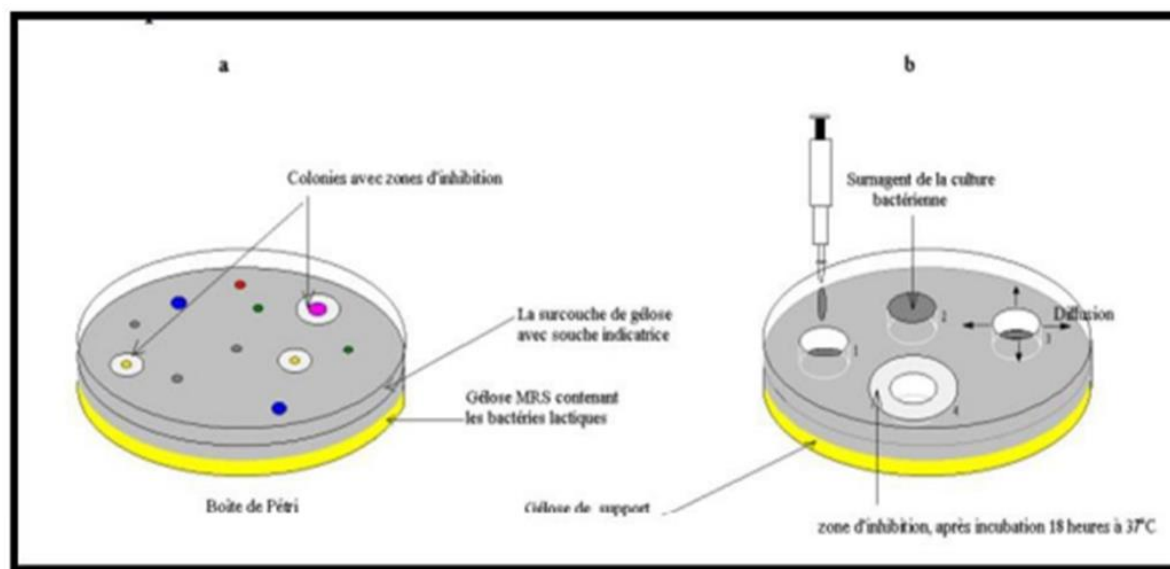


Figure 6: Méthodes utilisées pour la recherche des substances antimicrobienne. (a) méthode de la double couche, (b) méthode de diffusion en puits (Guessas, 2007)

II.1.6.3. Teste de dégradation des sucres :

Le test de dégradation des sucres de ces souches isolées a été réalisé sur un bouillon MRS.BCP (Badis et al., 2005).

Les différents sucres employés dans cette épreuve sont les suivants :

Mannitol, xylose, maltose, sucrase.

On a préparé des solutions sucrées en ajoutant 0,1g de chaque sucre à 10 ml d'eau distillée stérile. Chaque solution a été homogénéisée dans un vortex, puis stérilisée à 100°C pendant 10 minutes au bain Marie.

On a 10 souches jeunes, et chaque souche a été centrifugée à 6000 tours pendant 15 minutes.

Le culot a été récupéré et mélangé à de l'eau physiologie stérile, puis une deuxième centrifugation a été effectuée afin d'éliminer les restes de milieu de culture et d'obtenir un culot cellulaire pur. Cette centrifugation a été effectuée deux fois consécutives (Hansal, 2015).

Après on effectué l'ensemencement dans une microplaquette avec des puits. Chaque ligne horizontale contient un sucre qui sera utilisé par différentes souches. Chaque puits contient 0,1 ml de MRS.BCP, Une solution sucrée de 0,1 ml et une suspension bactérienne de 0,1 ml ont été combinées et elles ont été recouvertes d'une couche d'huile de paraffine.

La microplaquette a été incubées à 37°C pendant 24h (Guessas, 2006).

Chapitre III

Résultats et Discussion

Chapitre III. Résultats et Discussion

Les résultats obtenus lors de la réalisation de cette thèse sont présentés dans les parties suivantes : L'identification et l'isolement des BL du point de vue phénotypique, Analyses à la fois à l'échelle macro et microscopique, purification, analyse des caractéristiques technologiques des BL, Interaction des BL avec le listéria monocytogene, dégradation des sucres par BL.

III.1. Analyse microbiologie :

III.1.1.Examen macrobiologie et microbiologie :

❖ L'aspect macrobiologie :

Lors de l'observation macroscopique d'échantillons bactériens sur un milieu solide connu sous le nom de gélose MRS, les colonies obtenues ont été analysées de manière macroscopique (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) (Badis et al.,2005) (figure7)

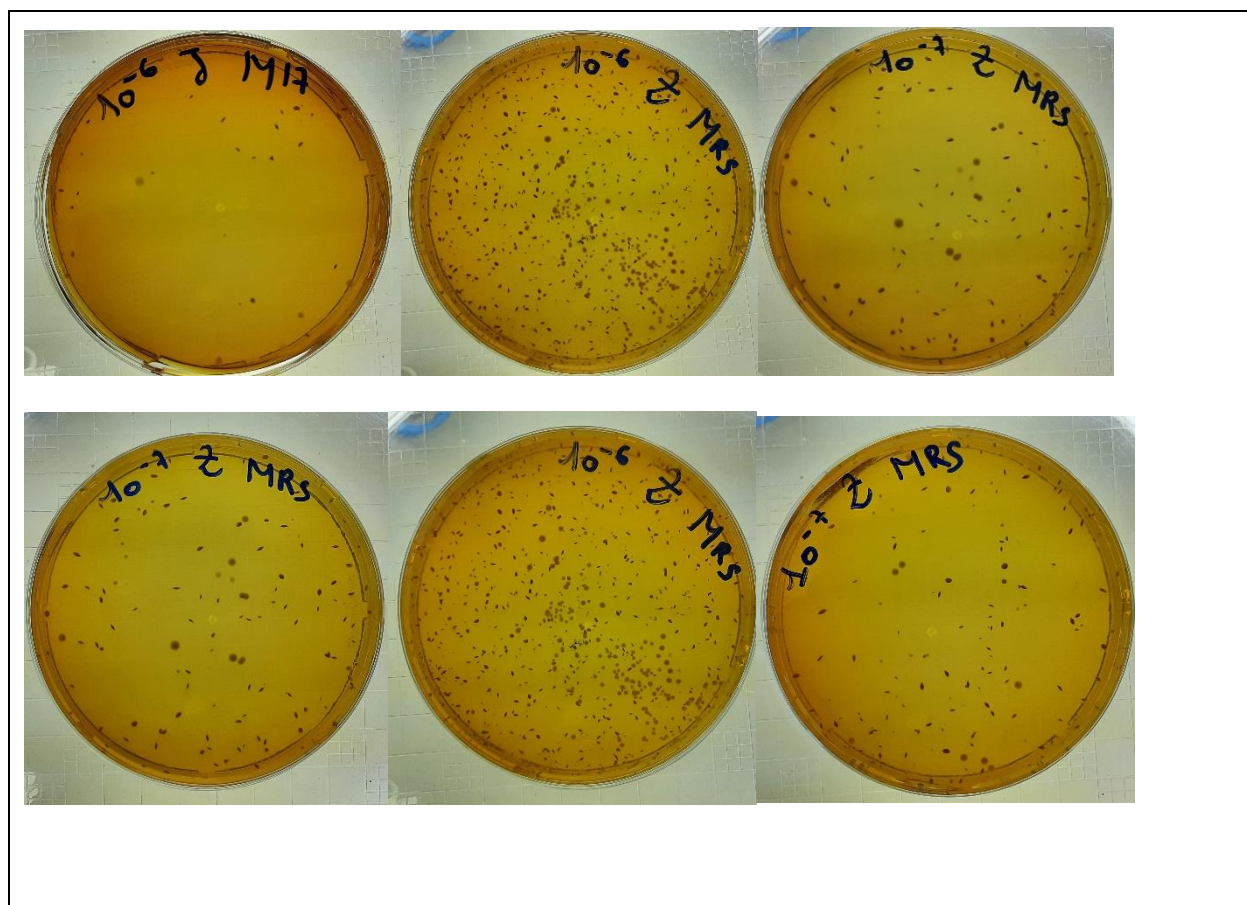


Figure 7: Aspect macroscopique des souches BL sur les milieux solides MRS.

Cependant, l'observation macroscopique nous a permis d'observer un trouble assez dense par rapport au témoin, ce qui suggère une croissance bactérienne au fond du tube.

(Badis et al., 2005).(figure 8)

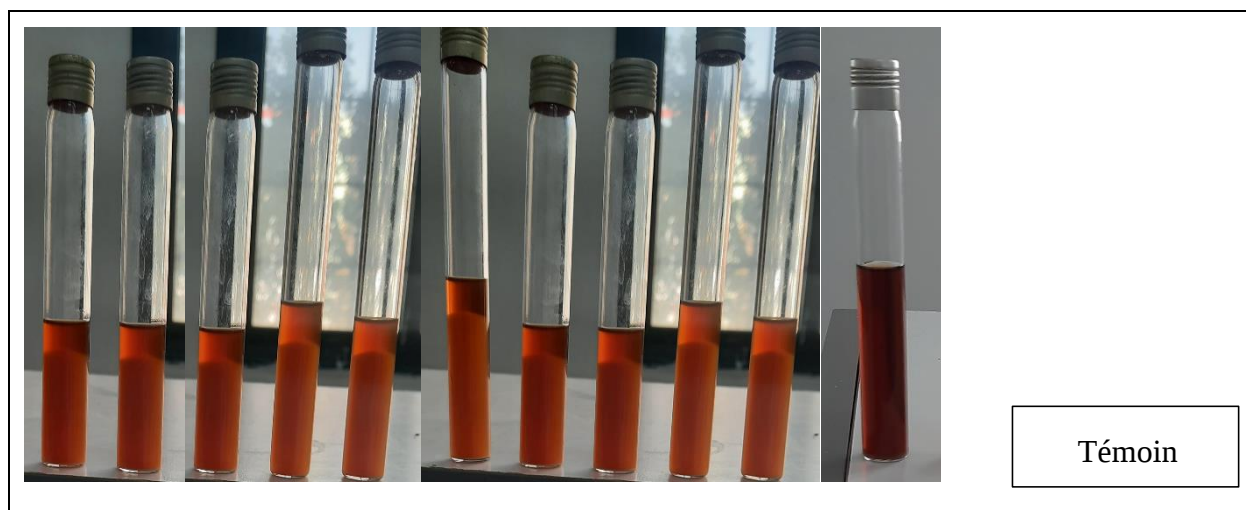


Figure 8: Aspect macroscopique des souches BL sur bouillons MRS

✚ D'après l'analyse macroscopique des souches de *Lactobacillus* développées sur un milieu liquide MRS, les colonies sont de couleur blanche, de petite taille et bien isolées. De plus, l'analyse au microscope après coloration de Gram révèle que ces bacilles sont clairement visibles sous la forme de bacilles Gram (+) (Bey, 2009). (figure 9)

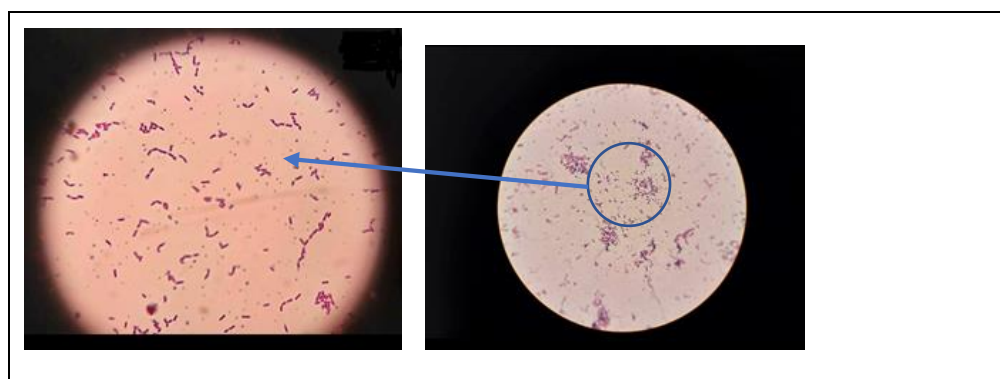


Figure 9: Aspect microscopique des souches BL après coloration de Gram

III.1.2. Teste biochimique:

❖ Teste catalase :

L'absence et présence d'effervescence (les buldaires) lors de l'ajout d'une goutte de H_2O_2 chez les souches BL isolées s'explique par le fait que ces bactéries ne sont pas catalasiques (figure10)

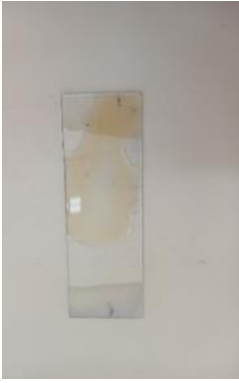
	
Catalase -	Catalase +

Figure 10: Résultat de teste catalase

III.1.3. Purification :

Macroscopiquement, on peut décrire des colonies pures d'environ 1 à 2 mm, de forme circulaire, et de couleur blanchâtre sur milieu MRS solide après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les critères obtenus sont assez similaires à ceux des critères de colonies de bactéries lactiques fournis (Flórez et al., 2005) (figure11)

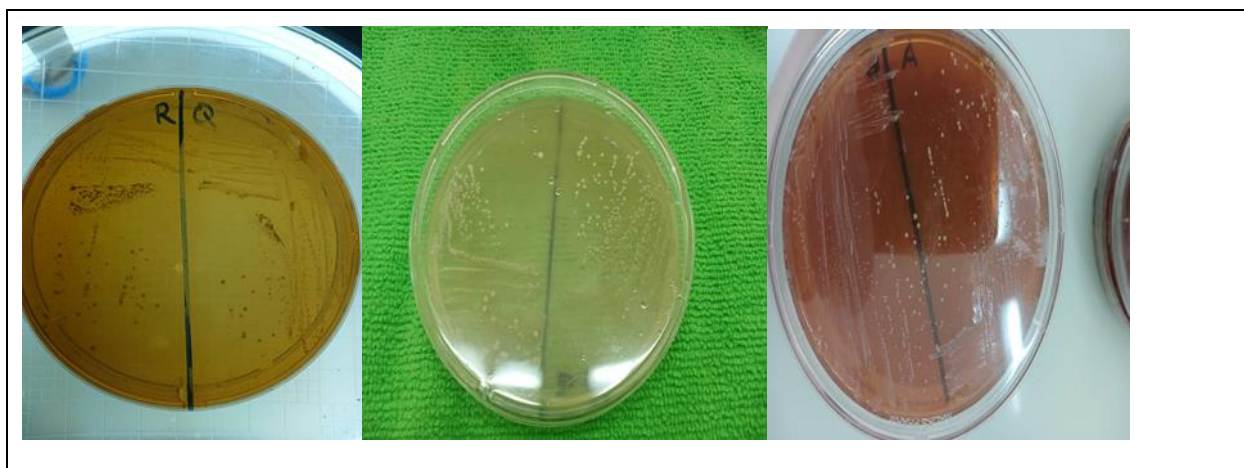


Figure 11: Ensemencement en stries et purification des souche bactérie lactique

III.1.4. Etude fermentaire :

❖ Type fermentaire :

Nous avons pu distinguer les souches homofermentaires des souches hétérofermentaires grâce à ce test. 6 souches homofermentaires (qui ne génèrent pas de CO₂) sont présentes dans la cloche de Durham, tandis qu'une 4 souche hétérofermentaire (qui génère du CO₂) est présente.

(Mathol et al.; 1994; Badis et al.:2005).

En plus de l'acide lactique, les souches hétérofermentaires vont générer l'acide acétique et le CO₂. Le gaz est produit lorsque la cloche durham et est vidée du milieu. (Kheddidi et al., 2009) (figure 12)

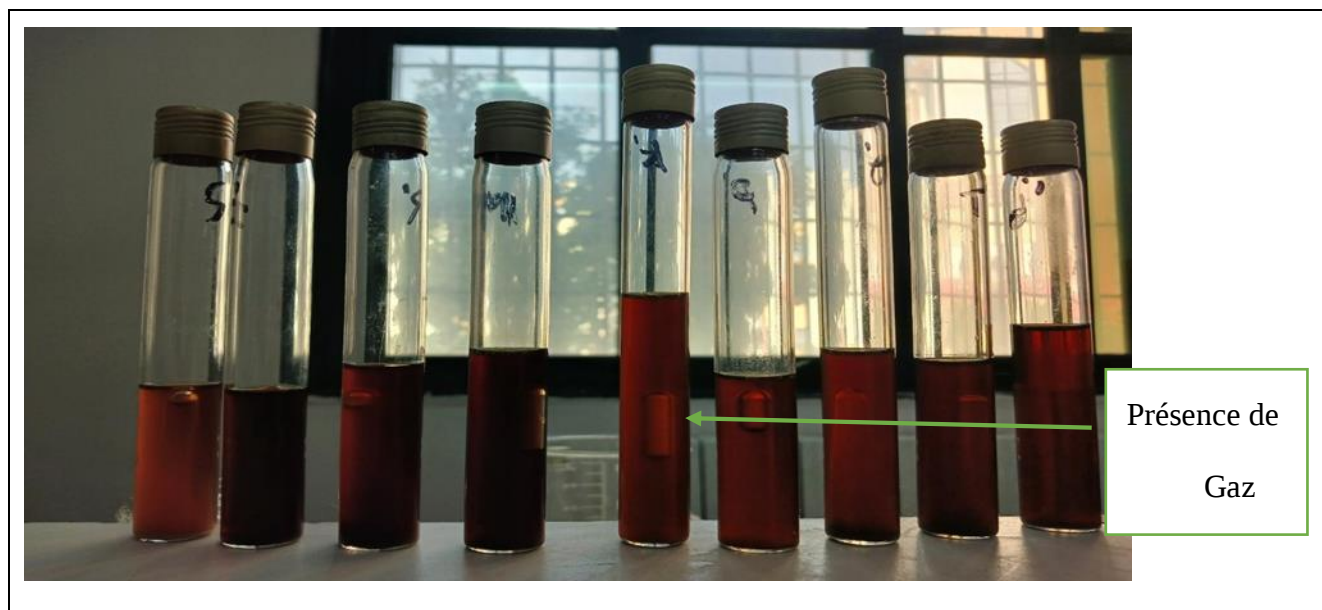


Figure 12: La croissance des souches de lactobacillus dans des tubes contenant le milieu MRS Bouillon et les tubes de cloche de Durham.

III.1.5. Test d'interaction entre les bactéries lactiques et listeria monocytogène :

Ce test va démontrer les capacités de certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches une fois qu'elles sont en contact.

Dans le cadre de notre étude des interactions, nous avons examiné l'impact des souches lactiques isolées à partir de jben traditionnel sur la souche de listeria monocytogène.

Selon les résultats obtenus, les 10 souches des bactéries lactiques étudiées, ils ont une inhibition de la croissance de listeria monocytogène (apparition des zones d'inhibition), ce qui signifie que ces souches ont une activité antibactérienne contre LM.

Ces résultats indiquent que nos souches sont capables de synthétiser des composés antibactériens sont des bactériocines.

Plusieurs études confirment ces résultats, (Savadogo et al.,2004). Les bactéries à Gram positif sont également plus susceptibles de subir l'effet bactéricide des bactéries lactiques, (Biswas et al.,1991). Les bactériocines sont principalement actives contre les pathogènes Gram positif et

produisent des pores dans la membrane cytoplasmique, ce qui perturbe les fonctions cellulaires (Benzeghious et al., 2009). (Figure 13 et 14)



Figure 13: Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (Méthode indirecte).

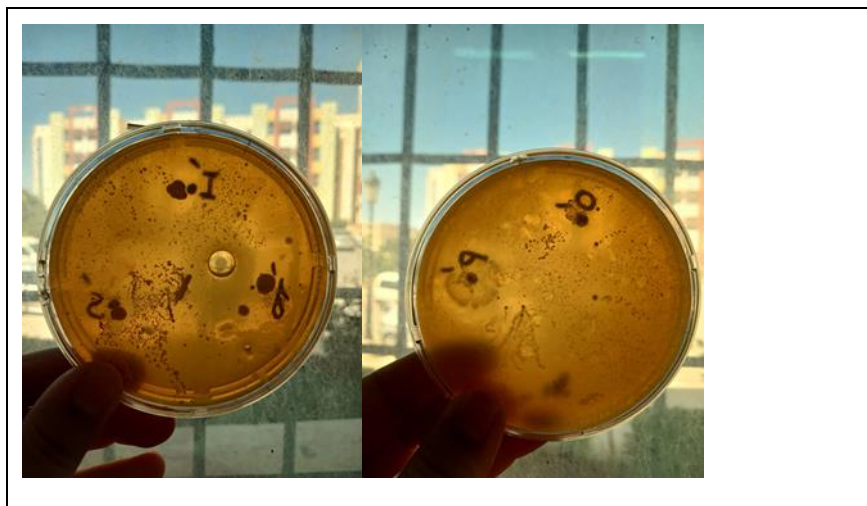


Figure 14: Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (Méthode directe).

III.1.6. Test de dégradation des sucres :

L'identification des isolats a été réalisée en utilisant un bouillon MRS-BCP pour fermenter 4 sucres : (xylose, mannitol, sucrase, maltose).

Le bromocrésol a été utilisé comme indicateur de pH dans ce milieu, et il a tendance à changer de couleur en jaune après avoir été acidifié. Cela témoigne de la dégradation des sucres par les bactéries (Hansal, 2015).

Les résultats révèlent une tendance à changer la couleur du milieu vers le jaune, à l'exception de quelques exceptions. Ainsi, les souches isolées ont la capacité de se développer à partir de différentes sources de carbone. (tableau 3) et (figure 15)

Souches sucres	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Mannitol	±	±	+	+	+	+	-	+	+	+
Sucrase	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 1: dégradation de sucre à partir les souches isolées

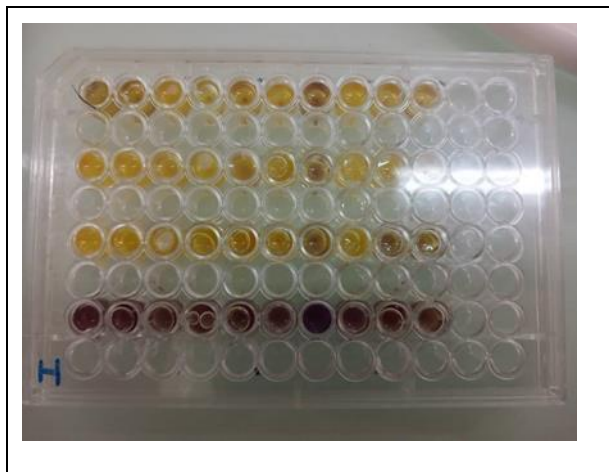


Figure 15 : Résultats de dégradation de sucre sur Micro blaue

CONCLUSION

Conclusion

Les bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans la préservation des aliments et la biothérapie en raison de leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes. Le pouvoir inhibiteur résulte de la synthèse de divers métabolites présentant des propriétés antagonistes, Comme les bactériocines.

L'objectif de cette étude consiste à mettre en lumière la production de bactériocines par les bactéries lactiques isolées à partir de la Jben traditionnelle et sélectionner et d'analyser des bactéries lactiques, ainsi que de tester leur efficacité antibactérienne en utilisant la méthode Direct et Indirect, contre *Listeria Monocytogene*

Dix souches actives ont été identifiées lors des tests de l'activité antibactérienne parmi ces souches lactiques isolées.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdelkader, A. (2015).** Évaluation et valorisation du procédé traditionnel de conservation des dattes « Btana » et détermination de sa biodiversité microbienne.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Ammor, M. S., & Mayo, B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science*, 76(1), 138-146.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), 454-461.
- Amrouche, L. (2003).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des Streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. Mémoire de magister, 1-59.
- Anas, M., Eddine, H. J., & Mebrouk, K. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*.
- Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N., & Gunasekaran, P. (2009).** Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin (s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource technology*, 100(2), 872-877.
- Axelsson, L. (2004).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1-66.
- Aygun, O., & Pehlivanlar, S. (2006).** *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control*, 17(8), 676-679.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., & Kihal, M. (2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21(3), 343-349.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005).** CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A

PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DEDEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES" ARABIA ET KABYLE". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, 30-37.

Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1984). Purification and characterization of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. Antimicrobial agents and chemotherapy, 26(3), 328-334.

Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. Food Microbiology, 21(4), 399-413.

Benzeghioua, H., Zemamouche, F., Bensayoud, S., & Boudjerda, D. J. (2009). Isolement et identification de quelques souches des bactéries lactiques à partir de tube digestif de Larus michahellis (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

BEY, F. (2009). Etude de l'interaction antagoniste entre Lactibacillus sp. et quelques souches d'entérobactéries (Doctoral dissertation, Université d'Oran1 -Ahmed Ben Bella).

Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by Pediococcus acidilactici H. Applied and Environmental Microbiology, 57(4), 1265-1267.

Chatellier, V. (2020). La dépendance de l'Afrique de l'Ouest aux importations de produits laitiers. INRAE Productions animales, 33(2), 125-140.

CHERIFI Sabrina et CHETIOUI Yamina;2019; Etude de l'activité antibactérienne des Lactobacillus isolées à partir du Lben traditionnel provenant de la commune de Ben Srour (M'Sila) à l'égard des quelques souches pathogènes ciblées; memoir master

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. International journal of food microbiology, 167(1), 29-43.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait, 83(4), 269-306.

Corfield, A. P., Myerscough, N., Longman, R., Sylvester, P., Arul, S., & Pignatelli, M. (2000). Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. Gut, 47(4), 589-594.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3(10), 777-788.

- Dahou, A., Homrani, A., Bensaleh, F., & Medjahed, M. (2015).** La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien « type j'ben »: connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique Science*, 11(6), 1-13.
- Dalet, K. (2000).** Approche moléculaire de l'action de bactériocines de bactéries lactiques contre *Listeria monocytogenes* (Doctoral dissertation, Poitiers).
- Delarras, C., & Trébaol, B. (2003).** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux: réglementation, prélèvements, analyses. Tec & Doc.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., & Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques* (Vol. 1, pp. 3-94). Loriga.
- Diouf, P. B., & Diouf, (2022)** I. HAL Id: hal-04476438.
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1).
- Doumandji, A., Hellal, A., & Saidi, N. (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 2, 25-47.
- Duteurtre, G. (2009).** La tradition laitière africaine: un héritage menacé?
- El Hassani, S. K. (2013).** La dépendance alimentaire en Algérie: importation de lait en poudre versus production locale, quelle évolution. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4(11), 152-158.
- EL KHADDAR, F. (2021).** Analyse bioinformatique du génome de *Listeria monocytogenes*: phylogénie; synténie; et étude pan-génomique.
- Farrow, J. A., Facklam, R. R., & Collins, M. D. (1989).** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 279-283.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current issues in intestinal microbiology, 8(2), 44.
- Fleming, H. P., Etchells, J. L., & Costilow, R. N. (1975).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied microbiology*, 30(6), 1040-1042.

- Flórez, A. B., Delgado, S., & Mayo, B. (2005).** Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian journal of microbiology*, 51(1), 51-58.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- Ghita, B. T. (2020).** Etude phénotypique et moléculaire des micro-organismes isolés des aliments et leurs environnement dans une structure de restauration hospitalière et pratiques d'hygiène.
- Ghrai, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., & Manai, M. (2008).** Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food control*, 19(2), 162-169.
- Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 591-606.
- GUESSAS, B. (2007).** Potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le Bio-contrôle de *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Guiraud, J., & Galzy, P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. (No Title).
- Hadjer (2021).** Contribution à La mise En Evidence De L'effet Antagoniste Des Bactéries D'intérêt Alimentaire Sur Des Champignons Attaquants La Pomme De Terre; MEMOIRE DE FIN D'ETUDE Master Académique
- Hamama, A., El Marrakchi, A., Mahi, N., & Abouddrar, W. (1995).** Préparation du jben pasteurisé à l'aide de levains lactiques sélectionnés. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 15(3), 27-32.
- Hansal, N. (2015).** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Magister en Biologie, Université d'Oran, 154p.
- Heng, N. C., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007).** The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In *Bacteriocins: ecology and evolution* (pp. 45-92). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., & Deutscher, J. (2005).** How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria*

monocytogenes virulence genes. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 9(3-4), 224-234.

Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159-169.

Ismaili, M. A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., & Zah, M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *IJMS*, 1, 81-94.

Jany, J. L., & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food microbiology*, 25(7), 839-848.

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE. (1998). Arrêté interministériel N°35 du 25 ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaire.

Karthikeyan, V., & Santhosh, S. W. (2009). Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pak J Nutr*, 8(4), 335-340.

Lanotte, P., & Isnard, C. (2016). Du prélèvement à la caractérisation des souches. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*, 15.

Larpent, J. P., & Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento Technique de Microbiologie* (3 éd.). Lavoisier: Londres, New York, Paris.

Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 315-337.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice*, 103-203.

Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries (p. 482). Paris: Doin.

Mathot, A. G., Kihal, M., Prevost, H., & Divies, C. (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *International Dairy Journal*, 4(5), 459-469.

Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), 1-20.

Melle Soualah Mohammed Nadjla Melle Guemari Malak Melle Ben Moussa Hadjer;2021; Contribution à La mise En Evidence De L'effet Antagoniste Des Bactéries D'intérêt Alimentaire

Sur Des Champignons Attaquants La Pomme De Terre; MEMOIRE DE FIN D'ETUDE Master Académique.39A

Messak, S., Hadri, S., BENAÏSSA, A., & TOUHAMI,2023.I. Activité antagoniste des bactéries lactiques (du genre *Lactobacillus*) isolées de la viande de dromadaire vis-à-vis de quelques souches pathogènes (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA).

Millet, L., Saubusse, M., Didienne, R., Tessier, L., & Montel, M. C. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 105-114.

Mitra, D., Roy, S., Chakrabarty, K., & Bhattacharya, B. B. (2012, August). On-chip sample preparation with multiple dilutions using digital microfluidics. In 2012 IEEE Computer Society Annual Symposium on VLSI (pp. 314-319). IEEE.

Mouna Ouadghiri, M. O., Mohamed Amar, M. A., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben).

Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2015). Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. 2. Singapore: Wiley-Blackwell.

Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.

Omar, N. B., Abriouel, H., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J. P., & Gálvez, A. (2006). Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 44-50.

Poznanski, E. L. I. S. A., Cavazza, A. G. O. S. T. I. N. O., Cappa, F., & Cocconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2), 141-151.

Radomski, N. (2005) Organisation de la gestion d'un souchier de *Listeria monocytogenes*.

Rejsek, F. (2002). Analyse des eaux: techniques et aspects réglementaires. Scérèn CRDP Aquitaine, Bordeaux. 358p

Riley, M. A. (2009). Bacteriocins, biology, ecology, and evolution.

- Roissart, H. D., & Luquet, F. M. (1994).** Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Viability of Lactic Acid Microflora in Different Types of Yoghurt; Grenoble: Lorica, France, 2.
- Rokop, Z. P., Horton, M. A., & Newton, I. L. G. (2015).** Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7261-7270.
- Salmeron, J., De Vega, C., Perez-Elortondo, F. J., Albisu, M., & Barron, L. J. R. (2002).** Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food Microbiology*, 19(2-3), 167-174.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., & Traore, A. S. (2004).** Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of nutrition*, 3(3), 174-179.
- Scardovi, V. (1986).** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V. (1983).** Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206.
- Schleifer, K. H. (1986).** Gram-positive cocci. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 999-1103.
- Seeliger, H. P. R. (1986).** *Listeria*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1235-1245
- Servin, A. L. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 28(4), 405-440.
- Souhila, T., & Ahmed, B. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technology*, (6), 71.
- Stackebrandt, E., & Teuber, M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 317-324.
- Tailliez, P. (2001).** Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le lait*, 81(1-2), 1-11.
- Temmerman, R., Huys, G., & Swings, J. (2004).** Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 348-359.

- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., & Swings, J. (2003).** Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 220-226.
- Thakur, R. L., & Utpal, R. (2009).** Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Research Journal of Microbiology*, 4(3), 122-131.
- Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., & Huys, G. (2008).** Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food microbiology*, 25(7), 929-935.
- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., & Wehrmüller, K. (2008).** Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 389-405.
- Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., & Zhang, L. (2011).** Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, 22(7), 1027-1031.
- Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, J. E., & Kihal, M. (2013).** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technology*, (8),

ANNEXES

Annexes

Matériels et Produits :

Afin d'effectuer les différentes parties expérimentales, nous avons utilisé le matériel suivant:

Jben :

Les échantillons de jben ont été conservés à 4°C jusqu'au moment d'utilisation. Une fois au laboratoire.

Les souches indicatrices:

Listeria monocytogenes

Cette souche a été fournie par Laboratoire d'université de M'sila

Milieu de culture:

- ✓ Les géloses: MRS (de Man-Rogosa et Sharp) : est utilisé pour la culture et dénombrement des lactobacilles dans les différents tests.
- ✓ MH (Mueller-Hinton): utilisé dans l'étude d'évaluation de l'activité antibactérienne des souches lactique.
- ✓ PCA (plate count agar)
- ✓ M17

Les bouillons :

- ✓ MRS : utilisé pour la croissance des bactéries lactiques.
- ✓ Nutritif.
- ✓ MRS BCP

Produits chimiques et réactifs :

Les colorants: Violet de Gentiane, fuschine, lugol, huile à émulsions

Autre produits : eau oxygénée H₂O₂, Alcool, eau physiologie, eau distillé, l'huile de paraffine, Mannitol, Xylose, Maltose, Sucrase

Appareillage:

L'appareillage utilisé est le suivant:

Agitateur électrique

Autoclave

Balance

Balance analytique

Incubateur

Micropipettes

Microscope optique

PH mètre

Réfrigérateur

Vortex électrique

Bec bunsen

Agitateur magnétique

Bain-marie

Plaque chauffante agitatrice

Centrifugeuse électrique Compteur de colonies

Micro plaque

Tube de Cloch de durham

Compteur de colonies

Stérilisateur UVC

Les Outils de la microbiologie

✓ Ance de platine

✓ Bec bunsen

✓ Boîtes de pétri

✓ Ecouillons

✓ Eppendorf

✓ Flacons

✓ Pipettes pasteur

- ✓ Tubes à essai
- ✓ Les lames
- ✓ Bécher
- ✓ Micro blaque
- ✓ Cloch de derhem
- ✓ Les embouts
- ✓ Tube de centrifugeuse

Milieu MRS ph (6,5)

Produit	poids
Polypeptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20g
Tween 80	1,08 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0.2 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Agar agar bactériologique	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 1h 20 min.

Milieu MRS liquide ph (6 ,5)

Produit	poids
Polypeptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1,08 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0.2 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 1h 20 min.

