

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté Des Sciences De la Nature Et De la Vie

Département de biologie Moléculaire et Cellulaire



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Biologie

Option: Microbiologie

Thème

Isolement et caractérisation des bactéries lactiques

à partir de fromage traditionnel

« *Bouhezza* » et étude de leur antagonisme

Présenté Par :

- ❖ FAHLOUL Wahiba
- ❖ ZOUGAGH Yassmine

Encadré par :

Dr. MERABTI R.

Soutenu Le : 05-06-2016

Devant le Jury :

Présidente : Dr .DEROUICHE F . MCB

U.A L. Khenchela

Promotrice : Dr . MERABTI R. MCB

U.A.L. Khenchela

Examinatrice : Mm . SBIHI F /Z . MCA

U.A.L.Khenchela

Promotion Juin 2016

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques de Microbiologie,
Université Abbes Laghrou- Khenchela




Remerciement

*Au terme de ce travail nous tenons à exprimer notre gratitude
et nous remercions pour tous les personnes qui ont contribué
à sa réalisation.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier, notre encadreur **Dr Merabti Ryma**
Pour son aide, ses conseils, son encadrement et sa Disponibilité.*

*Nous avons le grande plaisir de présenter nos remerciement à Mm la présidente
Dr : **DEROUICHE F** et Mm l'examinatrice **SBIHI F** pour évaluee ce travaille*



*Finalemnt, nous remercions tous ceux qui contribué de prés
Ou de loin à la réalisation de ce travail.*



Dédicace

C'est avec un très grand honneur que **Je dédie** ce modeste travail

À l'homme de ma vie,

Mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Que dieu te garde dans son vaste paradis,

À toi mon père.

**À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;
Maman que j'adore.**

À mon frère et père Karim qui a toujours été à mes côtés

À mes chers frères, ainsi que leurs femmes.

À mes jolies sœurs et spécialement ma princesses Dalal

À mes sourires Loay, Ritej, Iyad, Anfel et Sondos

À mes adorables amies : Samira, Samia, Wafa, Sihem, Hadjer, Sara

À mon binôme et ma sœur Yassmina

Enfin, **À tous ce qui ont de près ou de loin prêté main forte pour
Réussir ce modeste travail.**



Dédicace

Spécialement à mon père

Du fond de mon cœur et avec l'intensité de mes émotions, Je vous dédie ce modeste travail Pour son soutien, son encouragement et ses conseils pour m'avoir appris que la vie est un Examen perpétuel qu'on doit réussir. Rien au monde ne pourra vous compenser vos sacrifices durant mon éducation scolaire, Universitaire et pour mon bien être.

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien Mes études.

A mes très chers frères

Elbahi, Toutou et Mido .Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite. Merci pour vos précieux conseils, encouragements et pour la confiance que vous Me donnée toute la période de mes études

A mes très chères sœurs

Naima et son marie abd arhman, Mimia et son marie nasser, Somia et son marie salim, Joujou , Nadda et aussi Luizza et Besma , les mots ne suffisent guère pour exprimer L'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Pour les enfants

Rihabe, Walae ,Loujain, Janna , Anfal et pour Ramy ,Nizar ,Mostaffa ,Anas, Khalil Moaide

A mon binome et sœurs wahiba

Pour leurs conseils et leurs soutiens sans faille. Pour tous les BON moments que nous avons Partagées ensemble

Pour finir j'adresse mes remerciements à mes très chères amies qui sont devenus des soeurs pour moi :siham,sarra,hadjer, miriam,zineb, et autres,

Yasmine

Résumé

En Algérie, *Bouhazza*, produit laitier fermenté traditionnel, est le plus souvent consommé soit tel qu'il est, ou après un séchage afin de prolonger sa durée de conservation. Il contient une microflore productrice de substances antimicrobiennes.

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

Des dénombrements de la flore mésophile totale et de la flore lactique de ce produit laitier traditionnel ont été effectués sur les milieux MRS, où la charge de la flore mésophile totale est très élevée atteint jusqu'à (3×10^6 UFC/g).

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de 38 souches isolées (sur milieux MRS incubé à 30°C pendant 24h), de *Bouhazza* frais vis-à-vis plusieurs souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et des champignons : *penicillium*, *A. niger* et *A. flavus*). la recherche de l'antagonisme bactérien a été réalisée suivant la méthode de doubles couches et des piuits. Leur interactions a conduit à l'apparition des zones d'inhibition importantes.

L'identification et Les caractéristiques des souches ont révélé qu'ils appartiennent aux genres : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Entérocooccus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

Mots clés : *Bouhazza*, Bactéries lactiques, bio conservation, Antagonisme, bactériocine.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des photos.....	IV
Liste des tableaux	V

Partie bibliographique

Chapitre I : Les produits laitiers fermentés algériens

1. Introduction	3
2. Les produits laitiers	4
2.1 Les laits fermentés	4
2.1.1 <i>L'ben</i>	4
2.1.2 <i>Raïb</i>	4
2.2 Les fromages traditionnels	5
2.2.1 <i>Dhan</i>	5
2.2.2 <i>Djben</i>	5
2.2.3 <i>Klila</i>	6
2.2.4 <i>Aoules</i>	6
2.2.5 <i>Bouhezza</i>	6

Chapitre II : les bactéries lactiques

1. Introduction	10
2. Habitat	11
3. Caractéristiques.....	11
4. principales voies fermentaire des bactéries lactiques	12
4.1 La fermentation lactique	12
4.1.1 La voie homofermentaire ou d'Embden-Meyerhof-Parnas.....	13
4.1.2 La voie hétérofermentaire ou voie du pentose phosphate	13
5. Classification des bactéries lactiques.....	15
5.1 Taxonomie des bactéries lactiques	15
5.2 La classification de genre	17
6. Intérêt des bactéries lactiques	20
6.1 Dans l'industrie alimentaire.....	20
Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux	20
Activité protéolytique	21
6.2 Dans le domaine thérapeutique	21

6.3 Dans la biopréservation des aliments	21
Activité acidifiante (production d'acide lactique)	21
Activité bactériostatique (production de bactériocines)	22

Chapitre III : Activité antimicrobienne des BL

1. Introduction	23
2. Les substances antibactériennes.....	23
2. Les substances antibactériennes.....	23
2.2 Peroxyde d'hydrogène	23
2.3 Les bactériocines	24
2.3.1 La production des bactériocines	27
3. L'activité antifongique des bactéries lactiques.....	28

Partie expérimentale Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	29
2. Isolement et dénombrement de la flore lactique.....	29
3. Purification et sélection présomptive des BL	29
4. Identification partielles des isolats	29
4. 1 les caractères morphologique.....	30
4.1.1 Examen macroscopique	30
4.1.2 Examen microscopique	30
4.1.2.1 Etats frais	30
4.1.2.2 La coloration de Gram	30
4.2 Les caractères biochimiques.....	30
4.2.1 Test de catalase	30
4.2.2 Mannitol mobilité.....	31
4.2.3 Type fermentaire	31
4.2.4 Urée-Indole.....	31
4.2.5 Clark & Lubs	32
4.2.6 Croissance en présence de Na Cl	32
4.2.7 Thermo résistance	32

5. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	33
5.1 L'activité antibactérienne	33
5.1.1 Test de présélection	33
5.1.2 Confirmation de l'activité antibactérienne par la méthode de puits	35
5.2 L'activité antifongique	35

Résultats et discussions

1. L'isolement et dénombrement de la flore lactique	37
2. Identification partielle des isolats sélectionnés	40
3. Activité antimicrobienne	42
3.1 Test de présélection de l'activité antibactérienne	42
3.2 Teste confirmative de l'activité antibactérienne	45
3.3 Activité antifongique.....	48
Conclusion	51

Annexe

Références bibliographiques

Résumé

Abstract

ملخص

Liste de l'abréviation

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique ribosomique
ADH :	Arginine dihydrolase
ADPH :	dihydroxyacétone-phosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
FBA :	Fructose-1,6 bisphosphate aldolase
FBE :	Fructose-1,6-bisphosphate
<i>A. flavus</i> :	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A.niger</i> :	<i>Aspergillus niger</i>
AW :	Activité d'eau
<i>B.subtilus</i> :	<i>Bacillus subtilus</i>
BL :	Bactérie lactique
°C :	Degré celsius
CO₂ :	Dioxyde de carbone
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EMP :	Embden-Meyerhof-Parnas
FAO :	Food and Agriculture Organization
g/l :	Grammes/litre
GRAS :	Generally Regarded As Safe.
GAP :	Glycéraldéhyde-phosphate
H :	Heur
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
H₂O :	L'eau
KDa :	Kilodalton
Lb :	<i>Lactobacillus</i>
Lc :	<i>Lactococcus</i>
Li :	<i>Listeria</i>
MA :	Malte agar
MRS :	Man-Rogosa et Sharp
ul :	microlitre
mm :	milimetre
Min :	Minute

NaCl : Chlorure de sodium
OMS : Organisation mondiale de la santé
PH : Potentielle d'hydrogène
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
Sp: espèce non précisée
UFC : Unités Formant Une colonie

LISTE DES FIGURES

Figure 1. différents produits du lait fermenté	1
Figure 2. Fromage Bouhezza	5
Figure 3. Diagramme simplifié de la fabrication caractérisant du fromage Bouhezza.....	7
Figure 4. Représentation schématique des principales voies de f des BL.....	13
Figure 5. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres.....	18
Figure 6. Structure de la nisine A.....	25
Figure 7 Structures de de la mesarcidine	25
Figure 8 Caractéristiques microscopiques et macroscopiques des isolats.....	35
Figure 9. Antagonisme vis à vis d'Escherichia coli et de Listeria monocytogen.....	42
Figure 10 l'activité antibactérienne contre les Gram négatif par la méthode des puits.....	43
Figure 11 L'activité antibactérienne contre les Gram positif par la méthode des puits.....	43
Figure 12 l'antagonisme vis à vis de Bacillus subtilus , Staphylococcus aureus et Listeria monocytogenes par la méthode des puits.....	44
Figure 13. Antagonisme vis à vis Aspergillus flavus, Penicillium et Aspergillus niger.....	46

LISTE DES PHOTOS

Photo 1	Caractéristiques microscopiques et macroscopiques des isolats	38
	(A) coques à Gram +	
	(B) bacilles à Gram +	
	(C) catalase négative	
	(D) aspect des cultures en bouillon MRS	
	(E) et (F) aspect et couleur des colonies sur MRS agar	
Photo 2	Antagonisme vis à vis de <i>Listeria monocytogenes</i> (Gram +) et d' <i>Escherichia coli</i> (Gram -)	45
Photo 3	Antagonisme vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> (Gram -)	45
Photo 4	L'antagonisme vis à vis de <i>Bacillus subtilis</i> , par la méthode des puits.	48
Photo 5	L'antagonisme vis à vis de <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des puits.	48
Photo 6	L'antagonisme vis à vis de <i>Listeria monocytogenes</i> par la méthode des puits.	48
Photo 7	Antagonisme vis à vis d' <i>Aspergillus flavus</i> ,	51
Photo 8	Antagonisme vis à vis <i>Aspergillus niger</i>	51
	Antagonisme vis-à-vis <i>Penicillium sp</i>	51

LIISTES DES TABLAUX

Tableau 1.Caractéristiques physico-chimiques du fromage Bouhezza	6
Tableau 2.Différentes caractéristiques des BL.....	15
Tableau 3.Classification des bactériocines de bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005)..	19
Tableau 4.Liste des bactéries tests Gram positif et négatif	34
Tableau 5.les souches fongiques testé leur origine et leur code.....	35
Tableau 6.Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 38 isolats sélectionnés....	37
Tableau 7.Résultats des tests biochimiques de l'identification partielle des 20 isolats	39
Tableau 8.Résultats d'identification partielle des isolats	40
Tableau 9.Résultats de l'activité antibactérienne contre les Gram négatif.....	41
Tableau 10.Résultats de l'activité antibactérienne contre les Gram positif.....	42
Tableau 11.Résultats de l'activité antifongiques.....	45

LISTE DES ANNEXES :

Annexe1 :Coloration Gram

Annexe 2: L'eau peptoné

Annexe 4 : Clarck & Lubs

Annexe 3 : MRS (Man, Rogosa et Sharpe)

Annexe 5: Milieu PDA

Annexe 6 : Gélose nutritive

Annexe 7 : Mueller Hinton

Annexe 8 : Eau physiologie

Annexe 9 : Solution de tween

Annexe 10 : Composition de VP

Annexe 11 : Les matérielles utilisées

Annexes 12 : Photos de teste de préselection

Annexe 13 : Méthode des puits

Annexe 14 : La jarre d'anaérobiose

Annexe15 : Préparation de solution des spores fongiques



Introduction

La fermentation, dans une grande partie de l'histoire humaine, a été le moyen le plus commun de conservation des produits périssables (lait, viandes, légumes ...etc.). Elle contribue, grâce aux microorganismes, à plusieurs avantages comme l'ajout de nouveaux goûts, de saveurs, d'arômes et de textures. Elle permet également l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments, l'augmentation de leur digestibilité et l'élimination de substances toxiques (Kamal-Eldin, 2012).

Le microbiote fermentaire, joue un rôle clé dans la bio préservation des aliments, grâce à une variété de composés et de métabolites produits; acide organiques, CO₂, H₂O₂, Diacétyl, Acide phenyllacétique, Dipeptides cycliques, Bactériocines, Reutérine et acides gras. Ils agissent parfois de manière synergique dans les écosystèmes alimentaires complexes contre la détérioration des aliments et les microorganismes pathogènes (Corsetti et al., 2015).

La conservation des produits dans l'industrie alimentaire est essentielle au maintien de la qualité sanitaire et nutritionnelles des matières premières. En général, des conservateurs chimiques sont utilisés pour contrôler la flore d'altération des aliments et inhiber le développement des microorganismes pathogènes. Cependant, l'usage excessif de ces agents chimiques peut avoir des répercussions négatives sur la santé humaine. De plus, la résistance des microorganismes à la plus part des conservateurs, représente un réel problème en industrie alimentaire (Corsetti et al., 2015). La biopréservation constitue, donc, la meilleure alternative aux conservateurs chimiques, pour permettre la prolongation de la durée de vie des aliments et la préservation de la santé des consommateurs. Le microbiote fermentaire présente actuellement un intérêt scientifique particulier, car il constitue un réservoir précieux de microorganismes producteurs de substances bioactives particulièrement aux propriétés préservatrices de la matière alimentaire (Vandana bharti, 2015).

En Algérie, de nombreux types de fromages traditionnels de différentes régions du pays sont actuellement produits au niveau des ménages ou de façon artisanale. *Bouhezza* est un exemple de ces fromages du nord-est de l'Algérie (région des Chaouia), fabriqué et affiné dans des sacs de peau animale (chèvre ou brebis) appelés communément *Chekoua*. *Aissaoui Zitoun et al.*, (2014) ont montré que l'écosystème du fromage *Bouhezza* est dominé par la flore lactique indigène. À notre connaissance, il n'existe aucune étude sur les propriétés biotechnologiques, notamment antimicrobiennes, des bactéries lactiques isolées à partir de ce fromage du terroir algérien.

Afin d'étudier le potentiel biopréservateur de la flore lactique du fromage *Bouhezza*, nous avons ciblé, dans ce travail, les objectifs suivants :

- Isolement des BL à partir d'échantillons de *Bouhezza* fabriqués localement ;
- Caractérisation partielle des isolats ;
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des isolats sélectionnés



Chapitre I
Les produits laités
fermentés algériens

1. Introduction

L'augmentation de la production du lait durant certaines saisons, et la difficulté de son préservation sous la forme fraîche a conduit au développement des technologies de production traditionnelles (Dharam et Narender, 2007). Les produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait (Béal et Sodini, 2012). En plus de la conservation des solides du lait pour plus longtemps à température ambiante, la fabrication de produits laitiers traditionnels améliore la valeur alimentaire du lait. Une large gamme de produits laitiers fermentés est commercialisée à travers le monde. Il existe un grand nombre de laits fermentés provenant de plusieurs pays et qui diffèrent par leur matière première, leur flore microbienne, leur technologie, leur texture, leur goût et leur durée de conservation. Les produits laitiers traditionnels algériens importants qui ont la signification commerciale sont : *L'ben*, *Klila*, *Bouhezza*, *Jben*, *Rayeb*, *Dhan*, *Zebda* et *Takammarit* et autres (figure 1).

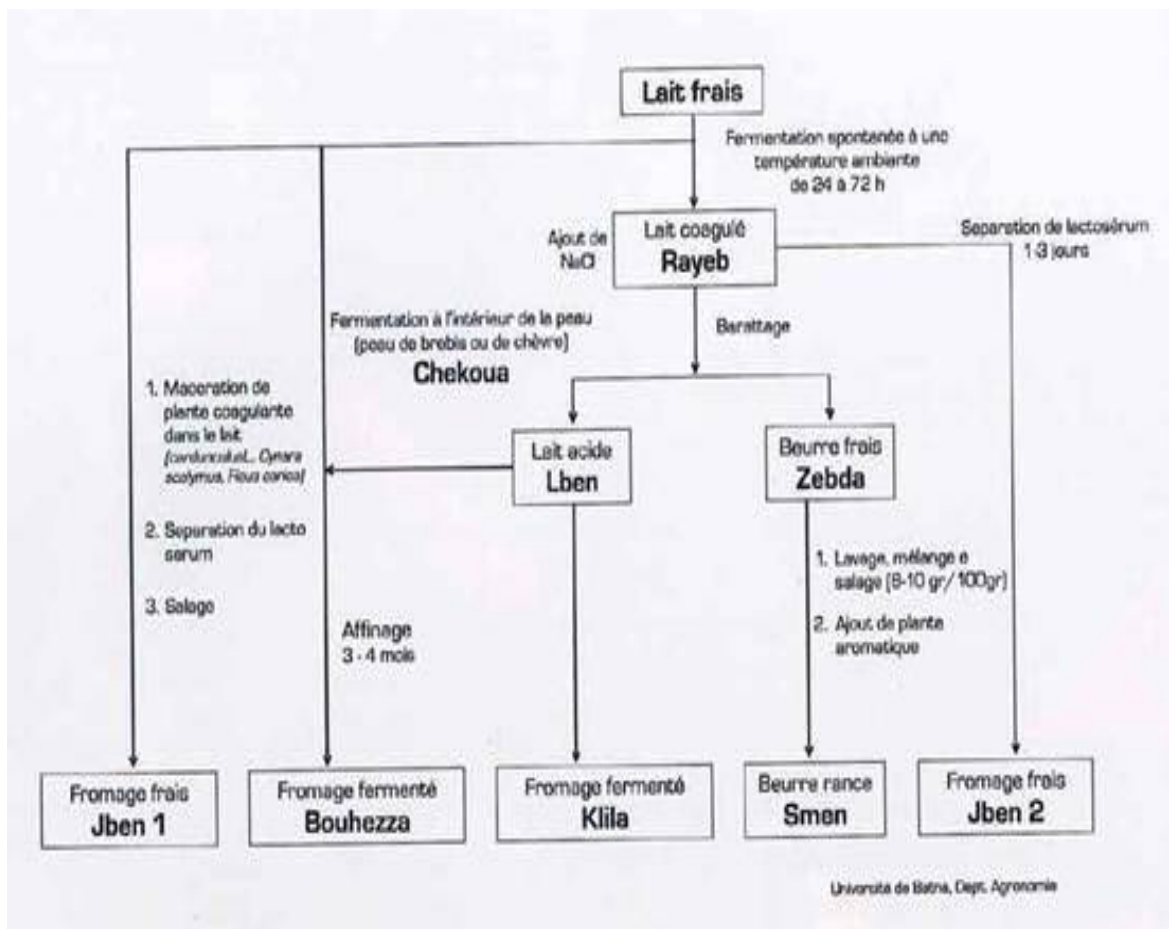


Figure 1 : différents produits du lait fermenté (université de Batna, Depart : Agro.).

2. Les produits laitiers

2.1 Les laits fermentés

Le lait est le produit le plus proche du concept « aliment complet » au sens physiologique du terme, car il renferme la quasi-totalité des nutriments indispensables à l'homme. C'est un aliment nutritif pour les êtres humains, indispensable pour le nouveau-né, comme pour l'adulte. Il constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (Chye *et al.*, 2004).

2.1.1 *L'ben*

À l'époque l'homme a commencé à domestiquer les espèces laitières et à utiliser leurs laits. Sa fermentation lactique lui donne son arôme naturel et sa saveur inimitable (Ouadghiri, 2009 ; Benkerroum et Tamime, 2004). *L'ben* est un produit lacté classé dans la catégorie « lait fermenté » très répandu en Algérie où il est consommé aussi bien à la campagne qu'en ville (Touati, 1990).

Sa préparation artisanale est simple il est fabriqué à partir du lait de vache, de brebis ou de chèvre. Le lait subit une acidification spontanée par sa flore originelle jusqu'à coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui

agit ou barattage, un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide suivant la température ambiante est ajoutée (Hallel, 2001), *L'ben* entre dans la fabrication de différents fromages traditionnels tels que *Bouhezza* et *Klila* (Aissaoui, 2004).

2.1.2 *Raïb*

Le *Raïb* a une très ancienne tradition en Algérie; il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait, comme de nombreux procédés traditionnels de fermentation, est spontanée et incontrôlée et pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones (Mechai et Kirane, 2008). Contrairement au *L'ben*, le *Raïb* ne subit pas une opération de barattage et d'écémage, il s'agit d'un lait fermenté entier.

2.2 Les fromages traditionnels

En Algérie, les fromages traditionnels sont peu nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés, environ dix types de fromages sont connus dans différentes régions du pays (Aissaoui zitoun *et al.*, 2011). Les fromages *Bouhezza*, *Mechouna* et *Madeghissa* sont fabriqués dans la région des *Chaouia* (Nord-est), *Takammèrite* et *Aoules* dans le sud, *Igounanes* dans la région de Kabylie (Aissaoui zitoun *et al.*, 2011), *Klila* et *Djben* sont connus dans plus d'une région (Hallel, 2001). Ces fromages restent encore non labellisés, leur fabrication est destinée à l'autoconsommation au niveau familial.

Les fromages sont des formes de conservation et de stockage et ont qualités nutritionnelles et organoleptiques sont très appréciées (Jeantet *et al.*, 2008). A l'échelle mondiale, il existe environ 1000 variétés de fromages différents (Irlinger mounier, 2009).

2.2.1 *Dhan*

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

2.2.2 *Djben*

Le *Djben* est un fromage traditionnel frais obtenu par coagulation enzymatique (présure extrait à partir de la caillette de veau). Le lait destiné à la fabrication est chauffé, une fois tiède, un fragment de caillette bovine est macéré dans le lait. Après coagulation du lait et égouttage, le caillé ainsi obtenu peut être salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatiques (Luquet et Corrieu, 2005 ; Abdelaziz et Ait Kaci, 1992).

Leur arômes, et leur propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du *Jben* dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (Poznanski *et al.*, 2004). Généralement, Le pH (<4,2) et l'acidité (> 0,9%) sont les paramètres les moins variables du « *Djben* ».

2.2.3 Klila

C'est un fromage ferment produit dans plusieurs régions de l'Algérie, il est fabriqué par un chauffage relativement modéré (55 à 75°C) du *L'ben* jusqu'à ce qu'il est caille (10 à 15 min). Le caille est ensuite égoutté spontanément ou pressé à l'aide d'une pierre, le fromage obtenu est consommée tel qu'il est frais au après un séchage il est utilisée comme un ingrédient après réhydratation dans les préparations culinaires traditionnels (Mennane et *al.*, 2007).

2.2.4 Aoules

Il est fabriqué à partir du lait de chèvre qui est extrêmement aigre. Après une coagulation intense, le fromage obtenu a une pâte dure L'égouttage se fait dans une paille ensuite, il est reformé sous forme des boules plates séchées au soleil (Abdelaziz et Ait kaci, 1992).

2.2.5 Bouhezza

Bouhezza est un fromage traditionnel algérien, fabriqué et consommé de puis l'antiquité par les populations *Chaouia*, qui vivent dans la région d'Aurès (Nord Est d'Algérie) (Aissaoui zitoun et *al.*, 2011; Aissaoui zitoun et *al.*, 2012). Il est très répandu dans l'est algérien plus précisément dans les régions d'Oum Bouaghi, Khenchela, et dans certaines régions de Batna (Mekentichi, 2003).

Les bactéries lactiques constituent la majeure partie de la microflore de *Bouhezza*, Selon Aissaoui zitoun et *al.* (2011a), Les ajouts successifs du *l'ben* au cours de la fabrication enrichissent la masse fromagère en bactéries lactiques. D'autres groupes microbiens sont présent Comme les moisissures, les entérobactéries, la flore protéolytique et lipolytique.

La *Chekoua* de *Bouhezza* (figure 2) est la peau animale entière (peau chèvre ou brebis) mais celle de chèvre est la plus utilisée se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité, (Aissaoui zitoun et *al.*, 2011). Préalablement traitée aux tannins pendant 3 à 4 mois. En effet, elle joue à la fois un rôle d'un contenant de la masse fromagère et d'un séparateur de phase, c'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé (Aissaoui zitoun et al, 2006).

La fabrication du *bouhezza* est une fonction périodique liée à l'abondance laitière au printemps et à la taille de *Chekoua*. Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément durant la période de fabrication (Zaidi et *al.*, 2000 ; Aissaoui zitoun et *al.*, 2011).

La préparation de *Bouhezza* débute habituellement en mois de mars jusqu'au mois de juin (Aissaoui zitoun, 2004), et s'étale de plusieurs semaines à quelques mois. La fabrication est lancée avec du l'ben salé (6 L à j 0, sel 25 g L⁻¹), puis des ajouts successifs de l'ben jusqu'à 42 j (3 L à j=1 et 1,5 L chaque deux jours); égouttage spontané et en continu; additions du lait frais entier entre 42 et 70 j *Bouhezza* est retiré de la Chekoua et assaisonné avec du piment rouge piquant en poudre. Leurs caractéristiques physicochimiques du *Bouhezza* sont illustrées dans le tableau 1.



Figure 2: Fromage *Bouhezza* (Aissaoui Zitoun et Zidoune, 2006).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du fromage *Bouhezza* (Aissaoui Zitoun et Zidoune, 2006)

	pH	Acidité	EST	MG/EST	MAT/EST	NaCl
Bouhezza	4	2,08 ±0,14	35,86±0,8	30 ,02	0,08	2,36±0,06

Le fromage est conservé dans la *Chekoua* (Zaidi, 2002), il peut être conservé aussi dans des récipients en verre ou en plastique (Aissaoui zitoun, 2004). *Bouhezza* peut être consommé sous forme de pâte plus ou moins ferme, de tartines sur pain ou délayable dans certains plats à sauces ou encore sous forme déshydratée après séchage et broyage manuel pour assaisonnement des plats traditionnels (*Aiche* et *Couscous...*). La consommation de fromage est possible à partir d'un mois de fabrication.

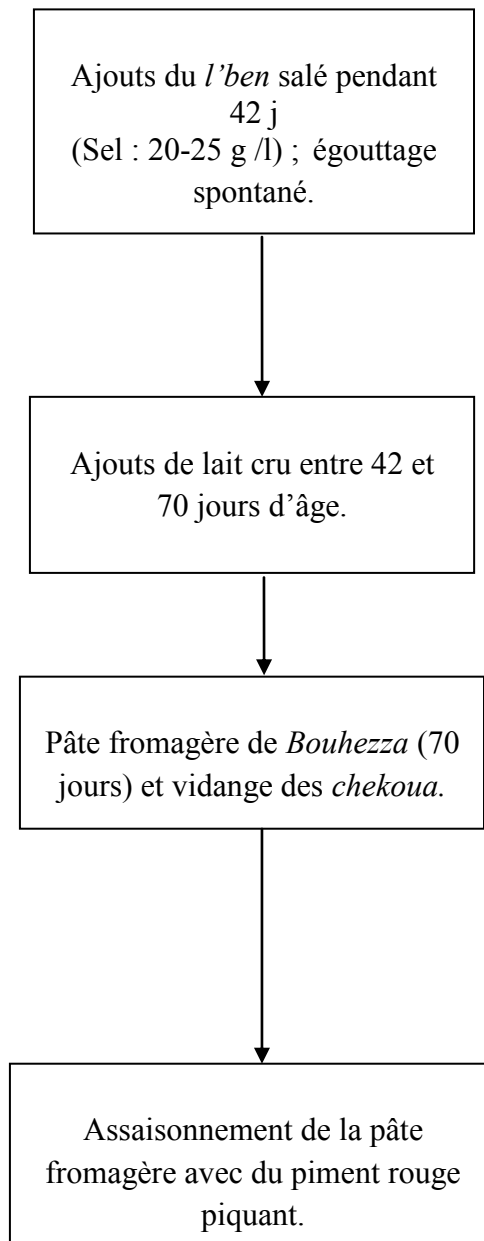


Figure 3: Diagramme simplifié de la fabrication caractérisant du fromage *Bouhezza* (70 j).

Chapitre II

Les bactéries lactiques

1. Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont des cellules vivantes, procaryotes, à coloration de Gram positives, et chimio-organotrophes. Les BL sont le plus souvent immobiles, jamais sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles. Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des bactéries lactiques, elles n'ont été utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits. Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Badis *et al.*, 2005). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale. (B. Mayo, *et al* 2010). Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Dortu et Thonart, 2009). Ce sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, et utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, et des salaisons (F.J.Carr, D. Hill, *et al* 2002). Elles sont utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Adams et marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993).

2. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif. (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993).

Les BL sont souvent retrouvées soit à l'état libre dans l'environnement comme le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...) et survivre dans ces milieux acides en raison de leur production d'acide lactique. , cette acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes : *Listeria monocytogenes* (*Li. monocytogenes*), Soit vivre en symbiose entre elles et avec un hôte tel que l'Homme ou l'animale (Klein *et al.*, 1998). Comme Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par certains BL telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*.

3. Caractéristiques

Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisants et texturants sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés pro-biotiques sont très utiles à la santé (Gorbach, 1996) (tableau 2).

Ce sont des cellules hétérotrophes et chimioorganotrophes. C'est-à dire qui requiert des molécules organiques complexes comme source d'énergie (Saad, 2010).

Elles sont incapables de réaliser la respiration. Toute leur énergie provient de la fermentation. Deux types de fermentation sont possibles :

- la fermentation homolactique : avec production d'acide lactique seulement.
- la fermentation hétérolactique : avec production en plus d'acide lactique, acétique, d'éthanol et de peroxyde de carbone (Morissert, 2002).

Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Salminen *et al.* 2004).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, vitamines, les sels, les acides gras, et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Elles fermentent les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les Substrats et, si les conditions de développement sont favorables (Callewaert, De Vuyst, 2000), de l'élaboration de bactériocines comme la nisine.

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 reutérine, le diacétyl et les bactériocines.

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hammes et Hertel, 2006).

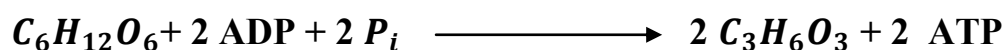
Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu (MRS), Qui offre aux bactéries à culture difficile sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80.

4. principales voies fermentaire des bactéries lactiques

Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propionique. Les fermentations alcoolique et lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes (Makhloufi, 2011).

4.1 La fermentation lactique

La fermentation lactique est réalisée par les bactéries lactiques pour produire l'acide lactique et d'autres métabolites tels que l'éthanol et le CO₂ et pour synthétiser l'énergie sous forme d'ATP (Figure 4). La réaction bilan de la fermentation lactique est :



Glucose

Acide lactique

Il existe deux voies principales de fermentation du glucose chez les bactéries lactiques :

4.1.1 La voie homofermentaire ou d'Embden-Meyerhof-Parnas

L'homofermentation regroupe la voie de la glycolyse, aussi connue sous le nom de voie EMP (Figure.4a).cette voie caractérise les bactéries homofermentaire et bactérie hétérofermentaire facultative .Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance suivie de la conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate, et la production deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. (Thompson et Gentry-weeks, 1994).

Dans certaine condition de croissance, le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers métabolisme mixte avec production plus de formiate, CO₂, acétate et éthanol (Cocaign Bousquet et al. 1996). La fructose-1,6 bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP, elle catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBE) à deux molécule a 3 carbone, le dihydroxyacétone-phosphate(ADPH) et le glycéraldéhyde-phosphate(GAP) (Raynaud, 2006).

4.1.2 La voie hétérofermentaire ou voie du pentose phosphate

Communément appelée voie des pentoses phosphate (Figure.4b), les bactéries lactiques fermentent le glucose en produisant en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentair. (Thompson et Gentry-weeks, 1994).

Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacilles* (Raynaude, 2006).

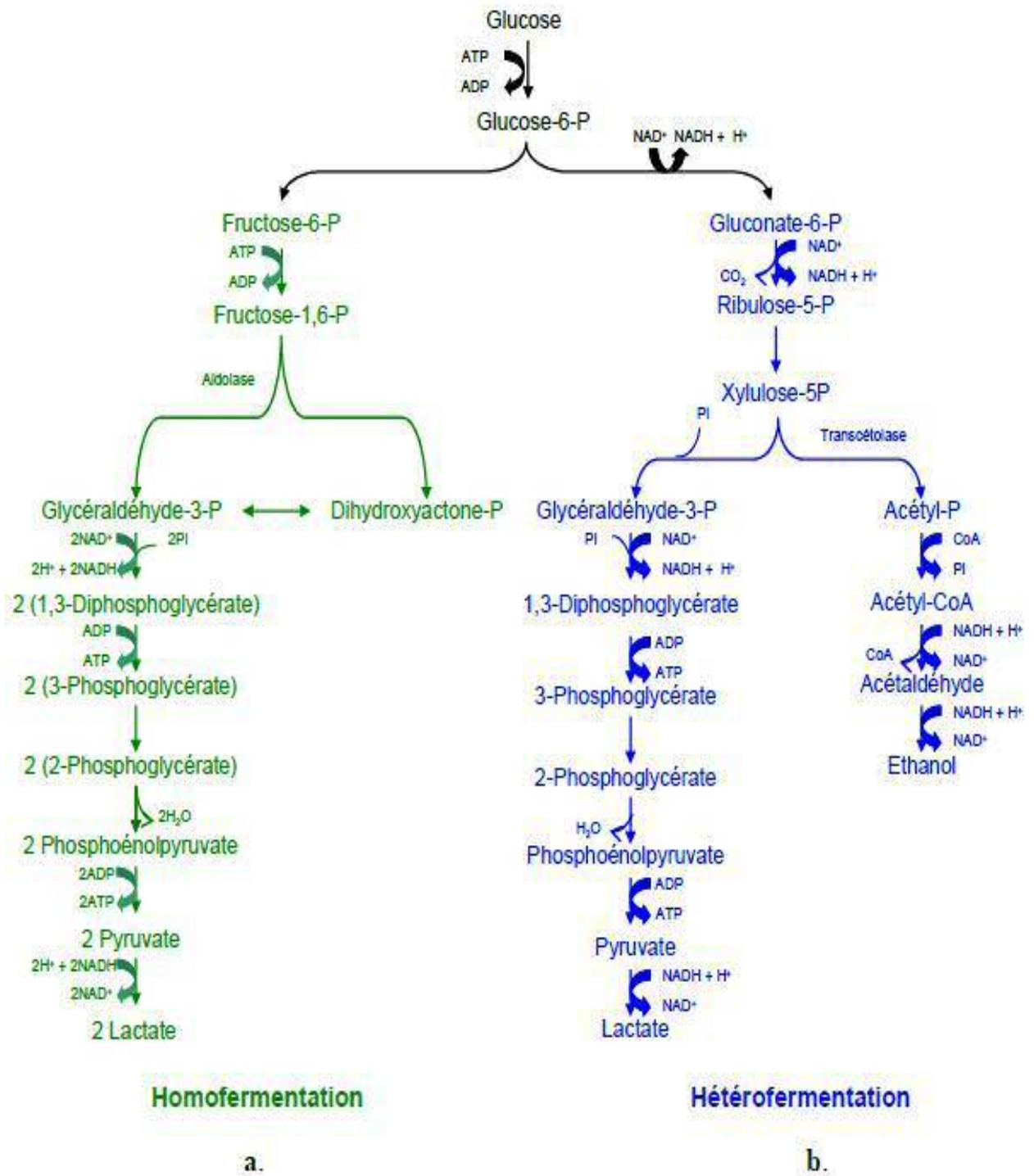


Figure 4: Représentation schématique des principales voies de fermentations chez les bactéries lactiques (Makhloofi, 2011).

5. Classification des bactéries lactiques**5.1 Taxonomie des bactéries lactiques**

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla- Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables : morphologiques, Biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimio taxonomiques (les constituants de la membrane cellulaire) (Krieg, 2001), une autre classification basé sur la composition de la paroi cellulaire bactérienne, incluant la nature des acides gras tels que l'acide lactobacillique et les acides gras insaturés qui la composent (Gilarová *et al.* 1994).

Les études d'hybridation ADN / ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenue depuis quelques années des éléments essentiels pour l'identification et la classification taxonomique des bactéries lactiques (Vandamme *et al.*, 1996).

Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (McLeod *et al.* 2008). 1

- **Le groupe I :** Renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.
- **Le groupe II :** Inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.
- **groupe III :** Regroupe quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales.

Tableau 2 : Différentes caractéristiques des BL (Axelsson, 2005)

Caractéristiques	Bâtonnets			coques						
	<i>Carno.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Lactoc.</i>			<i>Leucon.</i>			
				<i>Enteroc.</i>	<i>Vagoc.</i>	<i>Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i>
Formation de tétrade	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO₂^b	- ^c	±	-	-	+	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance à 6,5% NaCl	ND^d	±	+	+	-	±	±	-	+	+
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	+
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D, L,DL^f	L	L	L	D	L,DL^f	L	L	D, DL^f

+, positif ; -, négatif ; la réponse varie entre les espèces: ND , non déterminé.

a Les souches de *Weissella* peuvent avoir la forme de bâtonnets.

b Test pour l'homo- ou l' hétérofermentation du glucose: -, homofermentative: +, hétérofermentative.

c Petite quantité de CO₂ peut être produite suivant le milieu utilisé.

d Aucune croissance à 8% de NaCl n'a été rapportée.

e Configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose.

f La production de D-, L-, ou DL- acide lactique varie entre les espèces.

5.2 La classification de genre

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les Bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens (Figure.7). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire (Tableau 4), il s'agit de :

- ✓ ***Aerococcus*** : Les cellules de ce genre sont de forme ovoïde, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl.
- ✓ ***Carnobacterium*** : Ce genre est de forme bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en Paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl.
- ✓ ***Enterococcus*** : Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaire. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles. Elle se caractérise par sa tolérance à 6.5% de Na Cl, au pH : 9.6 et température de croissance 35°C
- ✓ ***Lactobacillus*** : Ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés et peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à pH : 5 et La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaire stricts, hétérofermentaire facultatifs et hétérofermentaire stricts.
- ✓ ***Lactococcus*** : Les cellules sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C et se développent à 4% de Na Cl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5.
- ✓ ***Leuconostoc*** : Ce genre comprend 10 espèces, les cellules sont sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH : 6.5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Ce sont des hétérofermentaire obligatoires.
- ✓ ***Oenococcus*** : Les cellules sont immobiles, asporulantes de forme sphérique, Avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, Leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

- ✓ ***Pediococcus*** : Ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Sont immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C.
- ✓ ***Streptococcus*** : Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes, fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Et leur température optimale de croissance est 37°C. Ce sont commensal ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.
- ✓ ***Vagococcus*** : Les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).
- ✓ ***Tetragenococcus*** : Ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes ; comme elles peuvent être isolées ou en paires. Leur métabolisme est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale est 25°C et 35°C.
- ✓ ***Weissella*** : Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaire. La Température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

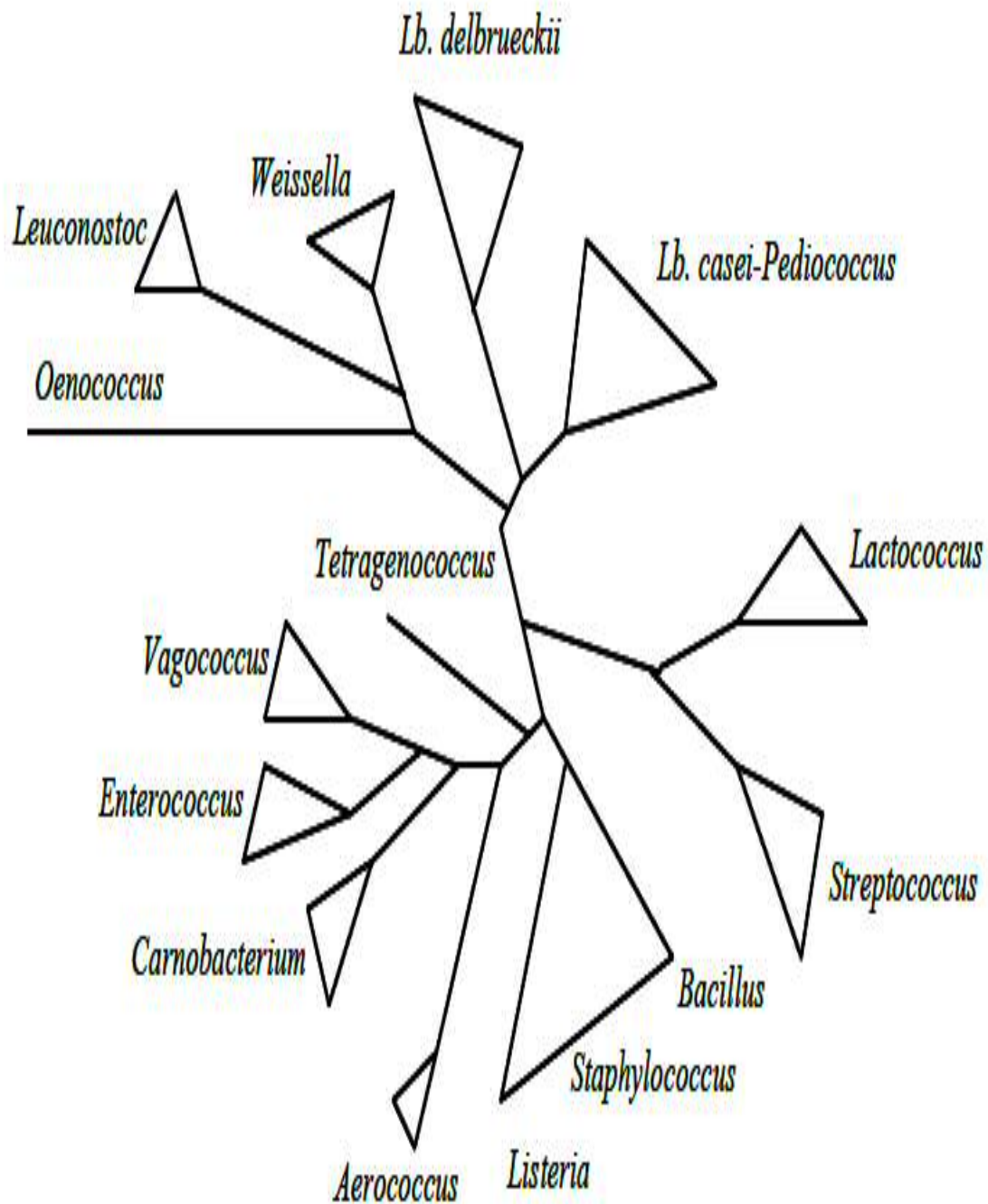


Figure 5 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après (Axelsson ,2004).

6. Intérêt des bactéries lactiques

Les BL interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Ils fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bio conservation des denrées alimentaires (Carmen, M. *et al.* 2000), Leur pouvoir antagoniste résulte aussi de la production de certains métabolites limitant la croissance de certains germes pathogènes. Pour cela de nouveaux produits sont développés, notamment dans le secteur laitier. Il est montré que certaines souches de bactéries lactiques peuvent jouer un rôle bénéfique pour la santé humaine (Tabak, S. 2007).

Sur les produits à base de viande, la croissance des bactéries lactiques entraîne l'apparition d'odeurs et de saveurs aigres ou rances (dus à la présence d'acide lactique ou d'acides gras volatils), de substance visqueuse (due à la production de polysaccharides) et de verdissement (dû à la présence de peroxyde d'hydrogène) (Vermeiren *et al.*, 2005).

6.1 Dans l'industrie alimentaire

Les BL sont impliquées dans la fermentation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001 et Moroni, 2007).

➤ Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux

Les sont capables de produire des composés d'arômes qui sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (Georgalaki *et al.*, 2002).

➤ **Activité protéolytique**

Elles possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides amines. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Buist *et al.*, 1998).

6.2 Dans le domaine thérapeutique

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique El-Ghaish *et al.*, (2011). Uehara *et al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

6.3 Dans la biopréservation des aliments

La conservation des aliments peut être assurée artificiellement par l'ajout d'inhibiteurs tels que le sel, la fumée, les composés chimiques (nitrate, nitrite...) mais aussi par la présence de bactéries lactiques. Elles ont en effet des propriétés inhibitrices intéressantes liées à différents mécanismes comme la compétition nutritionnelle et la production de métabolites qu'elles produisent naturellement lors de la fermentation (Dotru, 2008), de nombreuses recherches ont étudié le comportement antagoniste de ces bactéries, ce qui a amené l'identification et à la caractérisation de nombreuses bactériocines issues de ces bactéries ayant un potentiel d'application dans les produits alimentaires.

➤ **Activité acidifiante (production d'acide lactique)**

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

➤ **Activité bactériostatique (production de bactériocines)**

Les avantages d'utilisation de BL bactériocinogènes dans un aliment sont nombreux. Cela permet d'une part une conservation biologique sans avoir recours aux additifs chimiques (Rodgers, 2001). Elles donnent donc une image naturelle au produit. D'autre part, la croissance de ces bactéries est régulée par la température et permet la production continue de bactériocine *in situ* dans la matrice alimentaire, ce qui réduit les problèmes reliés à la décomposition et à l'adsorption des bactériocines aux constituants alimentaires lorsqu'elles sont ajoutées directement au produit. Cependant, ces bactéries ne doivent pas altérer les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de l'aliment dans le cadre de leur utilisation dans un produit non fermenté (Abee *et al.*, 1995; Rodgers, 2001).

Chapitre III

Activité

antimicrobiennes

1. Introduction

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules et de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

2. Les substances antibactériennes

Les acides organiques

Les bactéries lactiques produisent l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propionique ainsi qu'une faible quantité d'acide formique, d'acide succinique, et d'éthanol (Kostinek et al., 2005). En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries, y compris les ferments lactiques (Champagne et al. 1992 ; Kostinek et al., 2006). Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif (Jedidi, 2007).

Les acides organiques, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor *et al.*, 2007).

2.2 Peroxyde d'hydrogène

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

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

2.3 Les bactériocines

La découverte des bactériocines remonte au début du vingtième siècle lorsque Gratia (1925), démontre l'existence d'une substance inhibitrice, thermostable, provenant d'un dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli* V, Cette substance nommée colicine V inhibe la croissance d'une autre souche d'*E. Coli* : *E. coli* V.

La première définition du terme «bactériocine » produite par des bactéries à Gram négatif est établie en 1953 par Jacob et collaborateurs, donnèrent le terme de bactériocine à cette classe d'antagonistes. La bactériocine la plus connue (nisine), produite par une souche de, *Lactococcus lactis* fut décrite par Rogers en 1928. Depuis que la nisine a été autorisée comme additif alimentaire par EEC (1983) et par "Américain Food and Drug Administration par la possibilité de leur dégradation par les enzymes du tractus intestinal (Khaoua et al., 1997) .

Contrairement aux antibiotiques classiques, les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action antibactérien, généralement étroit, comprend souvent des souches appartenant à la même espèce que la souche productrice.

Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (Jack et al., 1995).

Les bactériocines exercent leur activité létale sur les bactéries à Gram positif en provoquant une lyse cellulaire. Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami et al., 2008 ; Gong et al., 2010 ; Naghmouchi et al ., 2010).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont classé en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ils se diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur poids moléculaire, leur structure tridimensionnelle, origines génétique ainsi que leur mode d'export et leur mécanisme d'action :

La classe I : regroupant les bactériocines modifiées post traductionnellement et synthétisés par voie ribosomique appelées les lantibiotiques, Ces derniers sont des peptides thermostables de taille inférieure à 5kDa subdivisés en deux types selon la structure :

- ✓ **Les antibiotiques de type A** : regroupent les peptides linéaires, comme la nisine A, qui forme des pores dans la membrane de la cellule cible (Buchman *et al.*, 1988) (Figure 8).

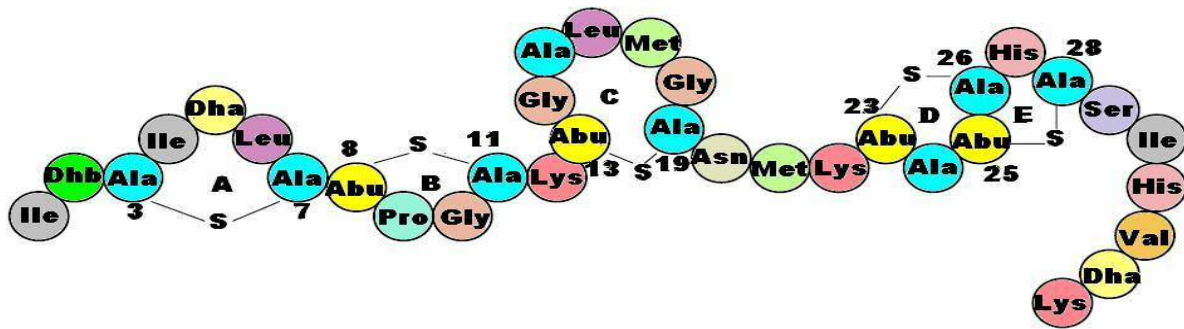


Figure 6: structure de la nisine A.

- ✓ **Les antibiotiques de type B** : regroupent les bactériocines globulaires, dont la plus connue est la mersacidine (Hsu *et al.*, 2003) (Figure9).

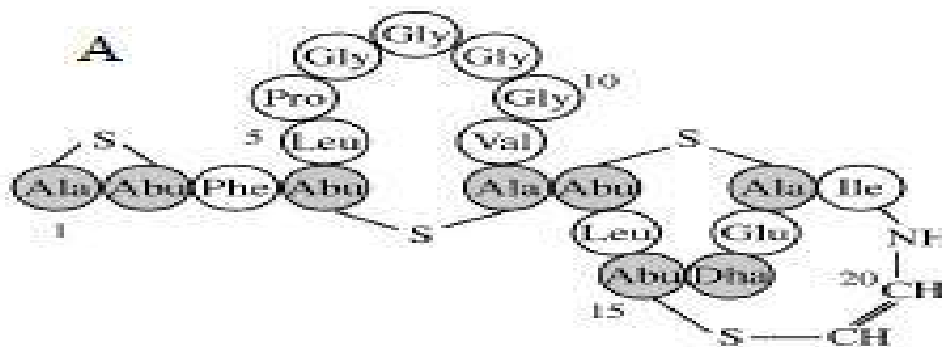


Figure 7: structure (A) : de la mersacidine produite par *Bacillus subtilis* (Hsu *et al.*, 2003).

La classe II : renfermant les bactériocines non modifiées et thermorésistantes appelées « pediocin-like ». Ce sont des peptides de taille inférieure à 10kDa et ne subissant pas de modification post-traductionnelle ; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un prépeptide qui sera mûri lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire.

La classe III : Regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire plus de 30 kDa. Et sont sensibles à la chaleur, ne sont pas thermostables (Jedidi, 2007). L'entérolisine A synthétisée par *Enterococcus faecalis*, appartient à cette classe et présente une activité anti-*Listeria* sp. (Nilsen *et al.*, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2008), elle dégrade la paroi de la cellule cible (Nilsen *et al.*, 2003).

La classe IV : regroupant des complexes protéiques liés à une partie lipidique ou glucidique (Heng *et al.*, 2007). Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Dortu *et al.*, 2009).

Tableaux 3 : Classification des bactériocines de bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005)

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

2.3.1 La production des bactériocines

Toutes les bactériocines sont produites par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice et codées par des gènes. Elles sont toujours synthétisées sous forme d'une molécule très peu active et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 2009 ; Tabasco *et al.*, 2009) et le peptide « signal » présent dans cette molécule, permet la sécrétion de la bactériocine dans le milieu extérieur.

3. L'activité antifongique des bactéries lactiques

Les BL sont connues pour leur aptitude à fixer les mycotoxines et à inhiber la croissance des moisissures toxigènes, en raison de leur acidification et de la production de composés de faible poids moléculaire au cours de la fermentation. Les acides organiques diffusent à travers la membrane des champignons et libèrent ainsi les ions hydrogène qui provoquent une chute du pH. En outre, les acides organiques augmentent la perméabilité de la Membrane plasmique et neutralisent le gradient électrochimique des protons, tuant ainsi le microorganisme. La production des acides organiques, seule, n'explique pas l'activité antifongique. Plusieurs composés antifongiques ont été entièrement ou partiellement caractérisés mais l'effet synergique reste mal connu. Les études supposent une sorte d'interaction positive, même si cela n'a pas été prouvé pour de nombreux métabolites (Dalié *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014).



*Matérielle et
Méthodes*

1. Echantillonnage

Les échantillons de *Bouhezza* utilisés proviennent de la région de Kais située au ouest de la wilaya de Khenchela. Dans notre étude nous avons utilisé un échantillon collecté le 11-04-2016. Immédiatement, l'échantillon de Bouhezza transporté au laboratoire de l'université dans un flacon stérile.

2. Isolement et dénombrement de la flore lactique

20 g de l'échantillon de *bouhezza* est ajoutés à 180 ml d'eau peptonée à 1% (annexe 2) et homogénéisés pendant 30 min sur la plaque d'agitation. Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-4}) est réalisée. 0,1 ml de la suspension microbienne est stérilement déposée à la surface de gélose MRS (Biokar Diagnostics). Les dilutions sont réalisées et réparties sur la surface par râtelier puis incubées à 30 °C dans les conditions d'anaérobiose pendant 48–72, h. L'anaérobiose est créée par le biais d'une bougie en jarre d'anaérobiose.

On calcule le nombre des colonies et on exprime les résultats sous forme du nombre de microflores lactiques totales à 30°C en tenant compte du facteur de dilution. Seules les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies sont prises en considération (Cheriguene et al., 2007).

3. Purification et sélection présomptive des BL

Pour avoir le maximum de diversité possible nous avons réalisé les premiers tests d'orientation, à partir des boîtes des dilutions les plus élevées. Les colonies, supposées représentatives, sont sélectionnées aléatoirement selon leur aspect macroscopique. Chaque colonie sélectionnée est purifiée par repiquage sur le milieu MRS agar. Pour l'identification présomptive des BL, de coloration de Gram et le test de catalase sont réalisés. Seules les cellules Gram positif et catalase négative sont retenues pour les analyses ultérieures.

4. Identification partielles des isolats

L'identification des isolats sélectionnés est établie par des méthodes classiques, basées sur les caractères morphologiques et divers caractères physiologiques et biochimiques proposés par Guiraud et Galzey (1980), Deroissert (1986).

4.1 les caractères morphologiques

4.1.1 Examen macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats; pour caractériser la taille, la forme, l'aspect des cultures sur milieu MRS et MRS agar (annexe 3) (Badis *et al*, 2005).

4.1.2 Examen microscopique

4.1.2.1 Etats frais

L'étude morphologique a été réalisée en prélevant une goutte de chaque suspension bactérienne et en les étalant sur une lame puis observée sous microscope optique pour caractériser la forme des cellules et la mobilité.

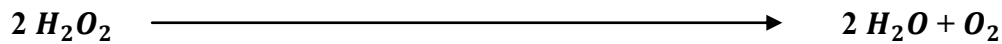
4.1.2.2 La coloration de Gram

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit en annexe 1. Cette coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets et les coques. Ce test permet de distinguer les bactéries selon qu'elles aient conservé le cristal violet après le traitement à l'alcool ou non, c'est une coloration différentielle qui permet de classer les bactéries en deux groupe : la bactérie Gram(+) fixent le cristal violet et apparaissent Violette ; et les bactéries Gram(-) ne fixent pas le cristal violet et apparaissent en Rose. Les bactéries lactiques sont des Gram(+) (Delarras, 2007).

4.2 Les caractères biochimiques

4.2.1 Test de catalase

Ce test est permet de vérifier si la bactérie possède l'enzyme catalase. Il est considéré comme premier critère d'orientation dans la classification d'une souche bactérienne, la catalase est une enzyme qui catalyse le peroxyde d'hydrogène avec libération d'une molécule d'eau et d'oxygène. Les BL sont dépourvue de catalase .La méthode de recherche de l'enzyme consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H_2O_2 La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz e. La réaction est positive lorsqu'un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse dans le liquide, est observé se qui traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

Catalase**4.2.2 Mannitol mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Ce test permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On ensemence avec une pipette pasteur les isolats étudiés dans le milieu gélosé (semi-solide) par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 24 h (Dellaglio *et al*, 1994).

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal *et al.*, 1991).

4.2.3 Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. (Zergoune F . 2015). Il consiste à mettre en évidence la production du CO₂. Des jeunes isolats ensemencées dans des tubes contenant du milieu MRS avec la présence d'une cloche de Durham qui permettent la mise en évidence du gaz produit (Carbonnelle *et al* ; 1990). Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Hariri *et al.* 2009).

4.2.4 Urée-Indole

Ce teste permet l'identification partielle des isolats, par la recherche d'une enzyme appelée uréase ce qui provoque une réaction acidifiante du milieu qui fait virer l'indicateur coloré, Une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml de milieu Urée-Indole, l'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48 h (Marchal *et al.*, 1991).

- Un virage de milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive.
- Deux gouttes de réactif de Kovacs sont additionnées. L'apparition d'un anneau rouge autour de tube indique un résultat positif.

4.2.5 Clark & Lubs

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre la fermentation « acides mixtes » et « butylène glycolique ». Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique en présence d'une base forte (soude ou potasse), l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné. Deux tubes contenant chacun 0,5 ml de milieu Clark & Lubs sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 37 pendant 48 h on ajoute deux gouttes de réactif VP 1 dans l'un des deux tubes et deux gouttes de réactif VP 2 dans l'autre.

- Une teinte rouge cerise indique une réaction VP 1 positive.
- Une teinte rouge indique une réaction VP 2 positive (Marchal et *al.* 1991).

4.2.6 Croissance en présence de Na Cl

L'ensemencement des isolats dans des tubes contenant bouillon MRS à 2 % et à 4% de Na Cl. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures (Zergoune F., 2015). La croissance des BL se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Badis et *al.*, 2005).

4.2.7 Thermo résistance

Le test de thermorésistant, permet de sélectionner des espèces thermorésistantes (Badis et *al.*, 2005). Les isolats à tester sont préalablement réparties dans des tubes de milieu MRS. Ces tubes sont par la suite incubé à une température de 62°C pendant 30 min en suite on incuber a 30 C° pendant 24 à 72 heures (Zergoune F,2015).

5. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

5.1 L'activité antibactérienne

5.1.1 Test de présélection

Dans cette partie, nous avons choisis 20 isolats parmi les 38 pour étudier leur antagonisme contre 8 souches tests impliquées dans les maladies infectieuses et les toxi-infections alimentaires (tableau 5). Les bactéries tests sont cultivées dans 5 ml de bouillon nutritif à 37 °C pendant 24h.

Pour étudier l'activité antibactérienne des 20 isolats, la méthode décrite par Duongdearn Suwanjinda *et al.*, (2007) à été adoptée. Les isolats sont mis en culture dans milieu MRS pendant 24 h à 30°C.

Le milieu MRS agar est coulé dans les boites de pétri, puis séchées dans l'étuve à 37 °C pendant 3 h. Des disques stériles (4 mm), préalablement préparés à partir de papier filtre Wattman, sont déposés à la surface des géloses récupérés après séchage. 5 µl de la suspension des isolats lactiques fraîchement cultivées sont ensuite déposés sur les disques. Un témoin est réalisé par l'ajout de 5 µl du milieu MRS. Les boites sont incubées pendant 24-48 h à 30°C en aérobiose.

Les géloses sont recouvertes par 5ml de gélose nutritive (0.8 % agar), précédemmentensemencée avec 0.1 ml de la suspension bactérienne tests. Après solidification, les boites sont incubées pendant 24-48 h à 30°C en aérobiose. L'activité est estimée par l'observation des zones d'inhibition.

Tableau 4 : Liste des bactéries tests Gram positif et négatif et leur référence

Bactérie	Gram	Référence
<i>Staphylococcus Aureus</i>	positif	ATCC 25923
<i>Listeria Monocytogenes</i>	positif	ATCC 25922
<i>Bacillus subtilus</i>	positif	ATCC 22332
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	négatif	ATCC 8739
<i>Klebsiella oxytacer</i>	négatif	ATCC 25922
<i>Acinetobacter bauna</i>	positif	ATCC 19606
<i>Salmonella sp</i>	négatif	ATCC 22890

5.1.2 Confirmation de l'activité antibactérienne par la méthode de puits

Dans cette technique les isolats sont ensemencés dans 5 ml de MRS afin d'obtenir des cultures jeunes après une incubation pendant 24h à 30C°. Une centrifugation de 10 min (5000tours /min) est réalisée. L'ensemencement des bactéries tests sur milieu Miller Hinton (annexe 7), est effectué par la méthode d'écouvillonnage. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés sur la gélose (annexe 13) (Allouche *et al.* ,2010). Chaque puits est rempli avec 50 µl du surnageant des cultures centrifugées. Un puits est considéré comme témoin est remplie avec 50µl du milieu MRS. L'incubation est réalisée à 30 C° pendant 24-48 h. La lecture se fait par la mesure du diamètre, en mm, des zones d'inhibition formées autour des puits. (Doumandji *et al.* , 2010)

5.2 L'activité antifongique

Dans cette partie, 20 isolats sont testés contres 3 souches fongiques mentionnées dans le tableau 6. Ces dernières font parties des moisissures d'altération et la production de mycotoxines.

Tableau 5 : les souches fongiques testé leur code

Moisissure	Référence
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC
<i>Penicillium sp</i>	ATCC
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC

Des suspensions de spores des souches fongiques tests sont préparées, dans des solutions de tween 80 (1%, v/v), (annexe 9et 15) à partir de cultures fraîches dans le milieu MA. Pour étudier l'activité antifongique des 20 isolats, la méthode décrite par Duongdearn Suwanjinda *et al.*, (2007) à été adoptée.

Les isolats sont mis en culture dans le milieu MRS pendant 24 h à 30°C. Le milieu MRS agar est coulé dans les boites de pétri, puis séchées dans l'étuve à 37 °C pendant 3 h. Des disques stériles (4 mm), préalablement préparés à partir de papier filtre Wattman, sont déposés à la surface des géloses. 5 µl de la suspension des isolats lactiques fraîchement cultivées sont

ensuite déposés sur les disques. Un témoin est réalisé par l'ajout de 5 µl du milieu MRS. Les boîtes sont incubées pendant 24-48 h à 30°C en aérobiose.

Les géloses sont recouvertes par 5ml du milieu PDA (0.8 % agar) (annexe 5), préalablementensemencée avec 0.1 ml de la suspension de spores. Après solidification, les boîtes sont incubées à température ambiante 3 à 5 jours. L'activité est estimée par l'observation des zones d'inhibition.



*Résultats et
discussions*

1. L'isolement et dénombrement de la flore lactique

Le dénombrement des BL mésophiles aéro-anaérobies sur MRS agar est de 3×10^6 UFC g^{-1} . 38 isolats sont sélectionnés, sur la base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques, à partir des échantillons de *Bouhezza* (photo 1 et tableau6).

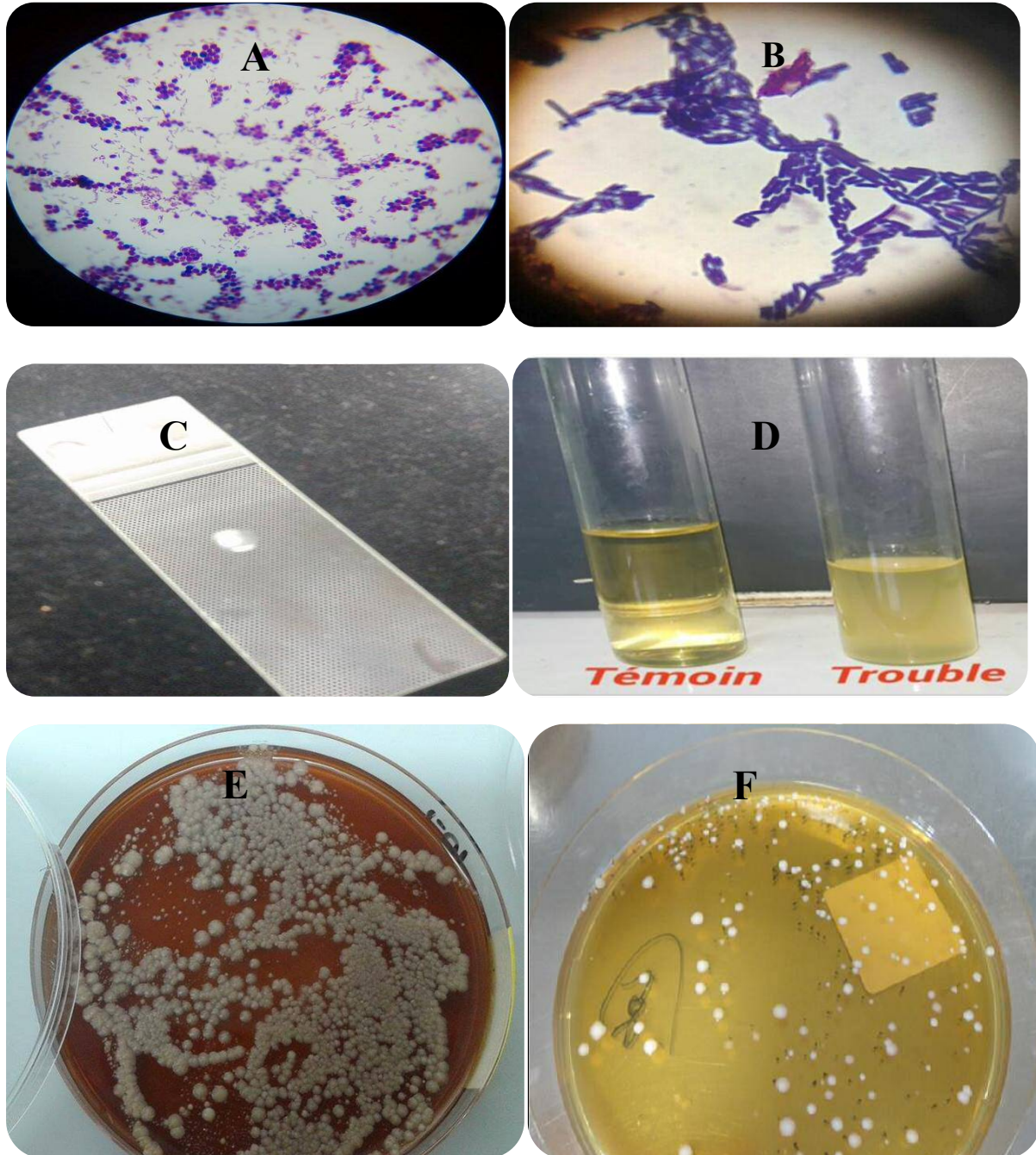


Photo 1: Caractéristiques microscopiques et macroscopiques des isolats. (A) coques à Gram + Gr x 40, (B) bacilles à Gram + Gr x 40, (C) : catalase négative, (D) : aspect des cultures en bouillon MRS, (E) et (F) : aspect et couleur des colonies sur MRS agar.

Résultats et Discussions

Tableau 6 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 38 isolats sélectionnés

Isolats	Caractéristiques macroscopiques		Caractéristiques microscopiques		
	Aspect et couleur de la colonie	Aspect de la culture en bouillon	Gram	Forme des cellules	Catalase
BL1	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Bacille	-
BL2	Petite, transparente	Culot moyen+ trouble intense	+	Coque	-
BL3	Plate, blanche	Petit culot + trouble clair	+	Bacille	-
BL4	Blanche, bombée	Culot moyen+ trouble intense	+	Bacille	-
BL5	Crémeuse, plate	Petit culot + trouble léger	+	Coque	-
BL6	Plate, blanche	Culot moyen+ trouble léger	+	Coque	-
BL7	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL8	Petite, transparente	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL9	Plate, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Bacille	-
BL10	Crémeuse, plate	Petit culot + trouble intense	+	Bacille	-
BL11	Crémeuse, blanche	Culot moyen+ trouble léger	+	Coccobacilles	-
BL12	Petite, transparente	Culot moyen+ trouble léger	+	Coque	-
BL13	Blanche, bombée	Petit culot + trouble clair	+	Bacille	-
BL14	Blanche, petite	Petit culot + trouble léger	+	Coque	-
BL15	Crémeuse, plate	Culot moyen+ trouble intense	+	Coccobacilles	-
BL16	Plate, blanche	Culot moyen+ trouble léger	+	Coque	-
BL17	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble intense	+	Bacille	-
BL18	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Coque	-
BL19	Petite, transparente	Culot moyen+ trouble intense	+	Coque	-
BL20	Plate, blanche	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL21	Crémeuse, plate	Culot moyen+ trouble léger	+	Bacille	-
BL22	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble clair	+	Bacille	-
BL23	Blanche, petite	Culot moyen+ trouble intense	+	Coque	-
BL24	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Coccobacilles	-
BL25	Plate, blanche	Petit culot + trouble intense	+	Bacille	-

Résultats et Discussions

BL26	Blanche, bombée	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL27	Blanche, petite	Culot moyen+ trouble léger	+	Coque	-
BL28	Plate, blanche	Petit culot + trouble clair	+	Bacille	-
BL29	Crémeuse, blanche	Culot moyen+ trouble intense	+	Bacille	-
BL30	Crémeuse, plate	Petit culot + trouble léger	+	Coque	-
BL31	Blanche, bombée	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL32	Petite, transparente	Culot moyen+ trouble léger	+	Coque	-
BL33	Blanche, bombée	Culot moyen+ trouble léger	+	Bacille	-
BL34	Blanche, petite	Culot moyen+ trouble intense	+	Coque	-
BL35	Plate, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Bacille	-
BL36	Crémeuse, plate	Petit culot + trouble intense	+	Bacille	-
BL37	Petite, transparente	Petit culot + trouble intense	+	Coque	-
BL38	Crémeuse, blanche	Petit culot + trouble léger	+	Coque	-

Suite du tableau 6

Les tests macroscopiques de la flore lactique du fromage *Bouhazza* nous ont permis de sélectionner 38 isolats, présentant des caractères similaires aux bactéries lactiques (Gram+, catalase-). Le dénombrement de la flore lactique mésophile totale montre que les échantillons de fromage *Bouhazza* étudiés contiennent 3×10^6 UFC/g. Cette valeur montre que nos échantillons ont une charge importante en BL. Dans la majorité des études réalisées sur les fromages *Bouhazza*, la microflore la plus dominante est formée essentiellement de bactéries lactiques. Ces résultats sont dans les moyennes rapportées par Aissauoi Zitoun *et al.* (2011, 2012, 2014). D'autre part, ces valeurs concordent également avec les dénombrement rapportés pour d'autres fromages traditionnels comme le *Djben* (Mennane *et al.*, 2007 ; Belyagoubi et Abdelouahid, 2013).

2. Identification partielle des isolats sélectionnés

20 isolats sur les 38 présélectionnés sont retenus pour l'identification partielle. Les résultats de la caractérisation biochimique sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Tests biochimiques de l'identification partielle des 20 isolats sélectionnés

Isolats	Teste mobilité		Clark & lubs	CO2	Urée indole	Na Cl		Thermorésistante
	Mannitol	Mobilité				2%	4%	
BL1	+	-	+	+	-	+	+	+
BL2	+	-	+	-	-	+	+	+
BL3	+	+	+	-	-	+	+	-
BL4	-	-	+	-	-	+	+	-
BL5	+	-	+	-	-	+	+	+
BL6	+	-	+	-	-	+	+	+
BL7	+	-	+	-	-	+	+	+
BL8	+	-	+	-	-	+	+	-
BL9	-	-	+	-	-	+	+	-
BL10	+	-	+	+	-	+	+	-
BL11	+	+	+	-	-	+	+	-
BL12	+	+	+	-	-	+	+	-
BL13	-	-	+	-	-	+	+	-
BL14	-	-	+	-	-	+	+	-
BL15	+	+	+	-	-	+	+	-
BL16	-	-	+	-	-	+	+	+
BL17	-	-	+	-	-	+	+	-
BL18	+	-	+	-	-	+	+	+
BL19	+	-	+	-	-	+	+	-
BL20	+	-	+	-	-	+	+	-

+ : test positif; - : test négatif.

En se basant sur les les critères mentionnés par Bourgeois et Larpent (1996) , et celles motionnées dans la partie bibliographiques pages et en comparant avec les résultats des tests de l'identification partielle de la flore lactique du fromage *bouhezza*, nous avons réparti les 20 isolats lactiques 6 genres : *Lactococcus sp.* , *Leuconostoc sp.* et *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.* , *Streptococcus* et *pediococcus sp* (tableau 8).

Tableau8: Résultats d'identification partielle des 20 isolats

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Enterococ sp.</i>	<i>Lactococcus sp.</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Streptococcus sp</i>	<i>Pediococcus sp</i>
BL1	BL6	BL19	BL2	BL5	BL7
BL3	BL16		BL10	BL8	
BL4	BL18		BL11		
BL9			BL12		
BL13			BL15		
BL14			BL20		
BL17					

Les tests de caractérisations préliminaires ont démontré que tous ces isolats à Gram positif et catalase négative se répartissent comme suit : 20 coques, 14 bacilles et 3 coccobacilles, avec différents modes d'associations. Ces résultats sont en accord avec des études sur la flore lactique de *Bouhazza*, où les coques sont décrits comme étant les plus dominants dans ce type de fromage traditionnels. Notre identification présomptive des genres des 20 isolats concorde également les genres lactiques décrits dans les fromages *bouhazza* et *Djben*, où les genres de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* , *Lactococcus* , *Pediococcus* *Streptococcus* et *Enterococcus* sont fréquemment isolés, en association ou non, à partir de ces fromages traditionnels(Aissauoi *et al.* , 2011, 2012, 2014 ; Bouadjaib ,2013 ; Abid , 2015).

3 Activité antimicrobienne

3.1 Test de présélection de l'activité antibactérienne

L'ensemble des résultats de l'activité antibactérienne contre les souches Gram (-) et Gram (+) sont résumés, respectivement, dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9: Activité antibactérienne contre les Gram négatif

Isolas	<i>Klebsiella</i> Gram - <i>oxytacer</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>
BL1	+	-	+	-
BL2	-	-	-	+
BL3	-	++	-	-
BL4	+	-	-	-
BL5	-	-	-	++
BL6	-	-	-	-
BL7	+	-	-	-
BL8	-	+	-	+++
BL9	-	++	+++	+++
BL10	-	+	-	+++
BL11	-	+	-	+
BL12	-	+	++	+
BL13	+	-	-	-
BL14	-	-	+	+
BL15	-	+	-	+++
BL16	-	-	-	-
BL17	+++	+++	++	+++
BL18	+++	+++	+	+
BL19	-	-	+	-
BL20	+	++	+	++

Absence de la zone (-), une zones d'inhibition faible (+), une zone moyenne (++) et une zone d'activité importante (+++).

Tableau 10: activité antibactérienne contre les Gram positif

BL	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus subtilus</i>	<i>Acinetobacter bauna</i>
BL1	-	-	-	-	-
BL2	-	-	++	-	-
BL3	++	++	++	-	-
BL4	-	-	++	-	-
BL5	++	+	+	-	-
BL6	+	+	++	-	+
BL7	+	+	++	-	-
BL8	-	-	-	-	++
BL9	+	+	+++	-	-
BL10	+	+	-	+	+
BL11	++	++	+++	-	-
BL12	++	++	-	-	-
BL13	-	-	-	+	-
BL14	+	+	-	-	--
BL15	++	++	+	-	+++
BL16	-	-	-	-	-
BL17	+++	+++	+++	++	++
BL18	+++	+++	++	+	++
BL19	-	-	-	-	-
BL20	+++	+++	++	++	++

Absence de la zone (-), une zones d'inhibition faible (+), une zone moyenne (++) et une zone d'activité importante (+++).

L'étude de l'antagonisme antibactérien, des 20 isolats sélectionnés, contre 4 souches Gram positif et 4 souches Gram négatif a montré que 6 isolats ; BL9, BL11, BL13, BL17, BL18 et BL20 ont une activité contre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (figure 10). Dans la présente étude nous avons mis en évidence l'antagonisme antibactérien et la potentialité inhibitrice naturelle des isolats lactiques contre les bactéries pathogènes, qui nous ont permis de remarquer des zones d'inhibition qui varient selon les souches tests. Des activités semblables sont décrites par Rodrigues et al., 2002 et Mansour et al., 2004 où 17 souches parmi les 25 souches isolées possèdent un effet inhibiteur contre les 6 souches pathogènes utilisées. Les travaux de Priscilia et al., (2015) ont également rapportés des diamètres d'inhibition importants de souches de *Lactobacillus sp* contre *Listeria monocytogenes* ATCC 29213 et *Escherichia coli* ATCC 25922 par la méthode de diffusion de disque.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

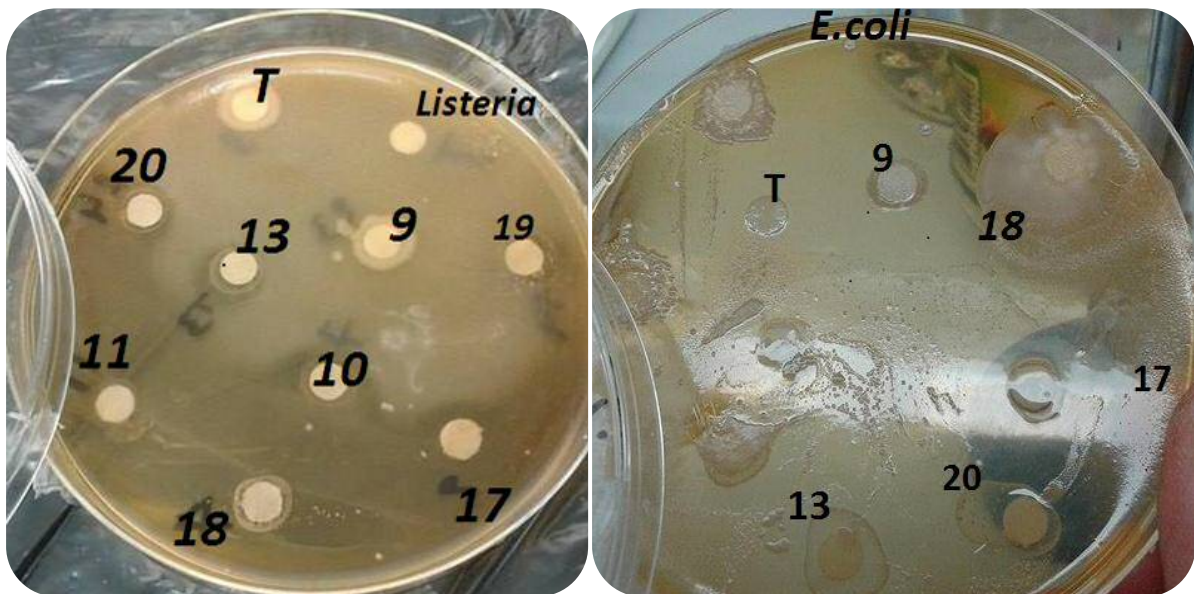


Photo 2 et 3 : Antagonisme vis à vis de *Listeria monocytogenes* (Gram +) et d'*Escherichia coli* (Gram -)

3.2 Teste confirmative de l'activité antibactérienne

Sur la base des résultats obtenu des tests de présélection, 3 isolats (BL 17 ; BL 18 et BL 20) avec les meilleures zones d'inhibitions sont choisis pour confirmer leur activité antibactérienne par la méthode des puits. Les résultats de l'antagonisme contre les souches tests Gram + et Gram - sont présentés, respectivement, dans les figures 11 et 12.

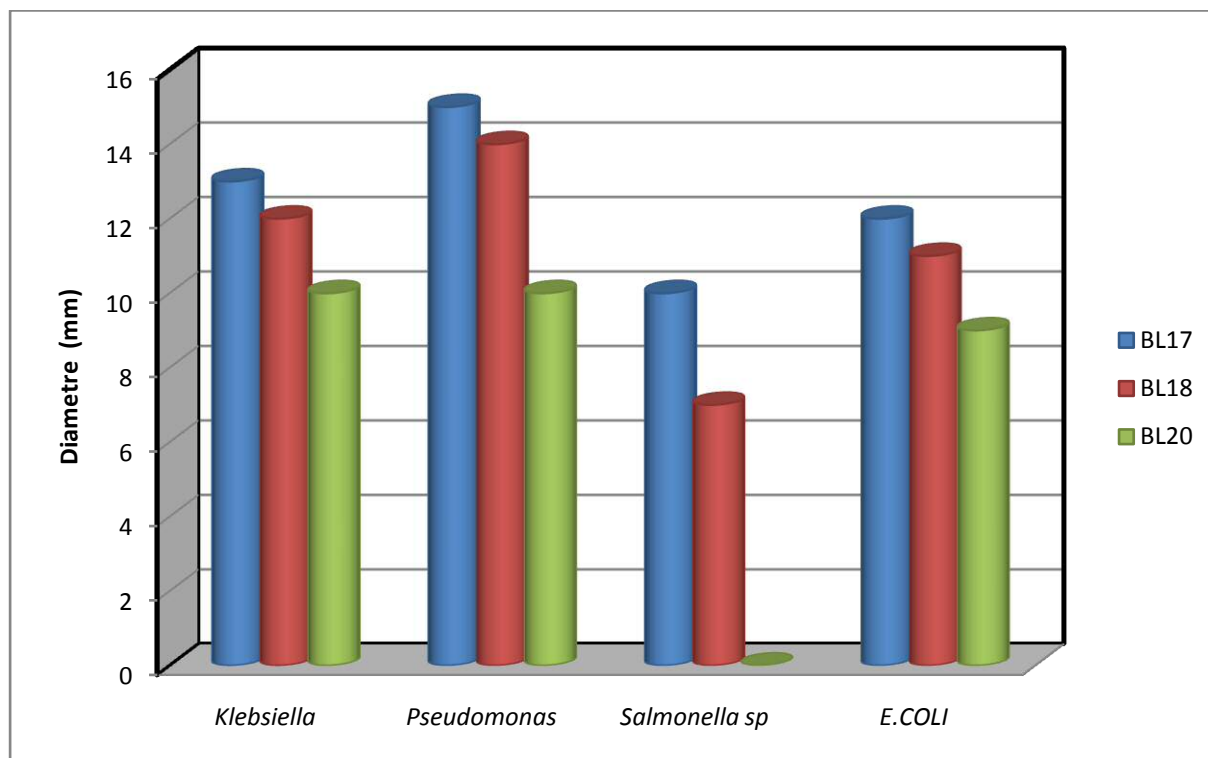


Figure 9 : L'activité antibactérienne contre les Gram négatif par la méthode des puits.

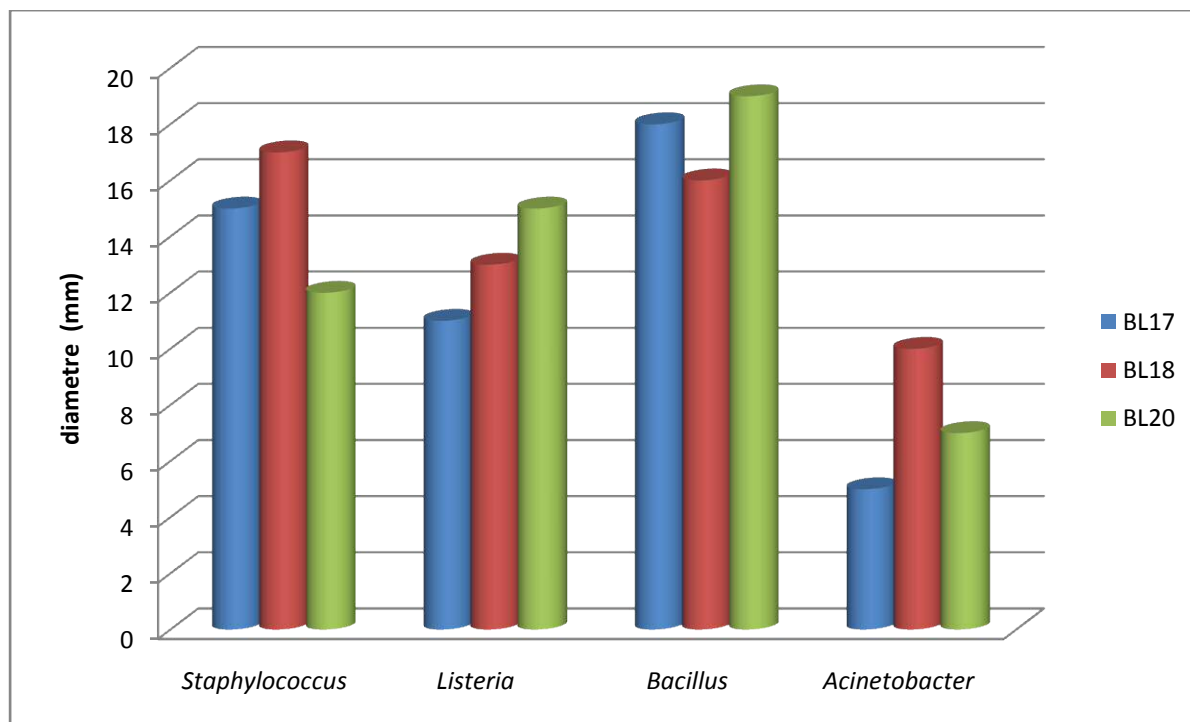


Figure 10 : L'activité antibactérienne contre les Gram positif par la méthode des puits.

D'après les résultats de teste des puits les 3 meilleures isolats sélectionnées (BL 17, BL18 et BL20) présentent une forte activité contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* concernant les Gram positif (figure 13). Pour *Pseudomonace aeruginosa* et *Esherichia colie* (Gram négatif) les zones d'inhibition sont comprises entre 14 à 17 mm. Les 3 isolats sont moins actifs contre *Salmonella sp* et *Acinitobacter*.

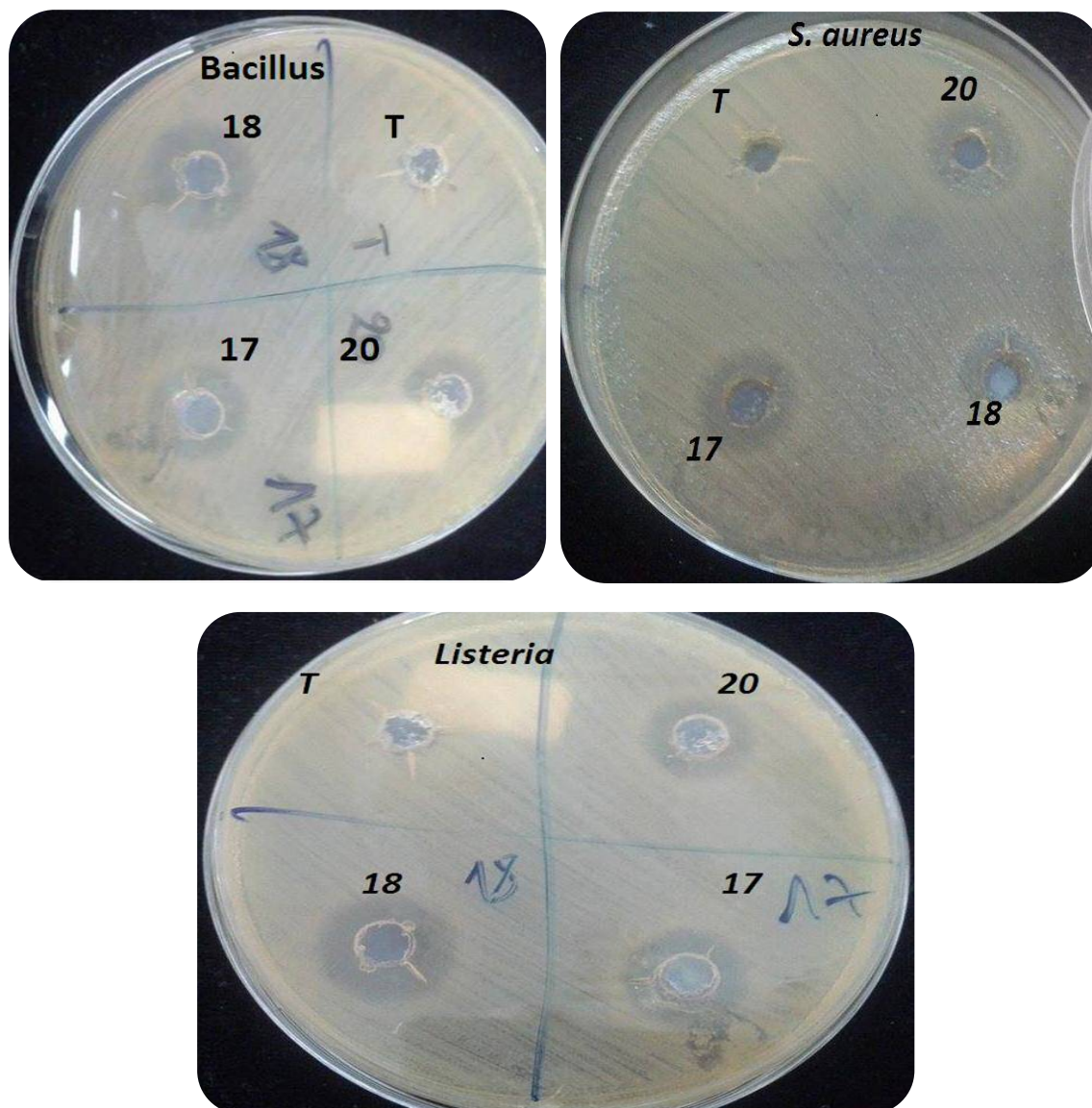


Photo 4,5 et 6 : L'antagonisme vis à vis de ; *Bacillus subtilus*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* par la méthode des puits.

Les zones d'inhibition obtenues par la méthode des puits concernant des 3 isolats sélectionnés sont assez importantes contre *Bacillus subtilus* (15 - 18 mm), *E. coli* (15-20 mm), *S. aureus* (15-17 mm) et *Listeria monocytogenes* (14 -19 mm). Nos résultats d'antagonisme concordent avec de nombreux travaux sur l'effet de la flore lactique indigène et fermentaire des laits crus et des fromages traditionnels sur la croissance des souches tests des mêmes espèces utilisées dans notre étude (Benmammer et Hamsi, 2003 ; Savadogo et *al.*, 2004 ; Bouzid, 2008 ; Boudjani,2009). En effet les BL sont connus par la production d'une variétés de substances et métabolites à activité antibactérienne ; acide organiques, CO₂, HH₂O₂, Diacétyle, Acide phenyllacétique, Dipépétides cycliques, Bactériocines, reutérine

et acides gras. Ils agissent contre la détérioration des aliments et les microorganismes pathogènes (Corsetti et al., 2015)

3.3 Activité antifongique

L'ensemble des résultats de l'activité antifongique est résumé dans le tableau 11 et la figure 18. Dans la présente étude, 9 isolats sur un total de 20 isolats de BL testés (20-18-17-15-13-12-10-9-8) ont montré une activité antifongique prometteuse, basée sur l'apparition d'une zone d'inhibition formée autour des disques, contre les souches fongiques testées. Nous avons remarqué qu'il y a une forte activité antifongique présentée par les isolats : BL 10, BL 18 et BL 20 contre *Aspergillus flavus* et *Penicillium*. Cependant ces 3 isolats ont une faible activité antifongique contre *Aspergillus niger*. Yousef, *et al.*,(2007) et Belal *et al.*,(2011), ont rapportés des résultats similaires aux nôtres. Ils ont trouvé que des isolats du genre *Lactobacillus* possédaient une activité contre *Aspergillus flavus* et *Penicillium*. *sp.*

Un spectre considérable d'activité antifongique est montré contre *Aspergillus flavus* et *Penicillium*, par les isolats suivants: BL 8, BL 9 BL12, BL13, BL15 et BL17. M.*et al.*, (2002) ont écrits des activités antifongiques de souches lactiques contre les espèces fongiques testées de notre travail. Les BL exercent un antagonisme par la production de substances antifongiques, largement démontrée dans de nombreux travaux de recherche (Mandal et al., 2013; Crowley et al., 2013).

Tableau 11 : Résultats de l'activité antifongiques

Isolats	Moisissure	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BL1		-	-	-
BL2		+	+	+
BL3		++	+	+
BL4		+	+	-
BL5		-	-	+
BL6		-	++	-
BL7		++	++	-
BL8		+	+++	+
BL9		+++	++	+
BL10		+++	+++	+
BL11		-	-	-
BL12		+++	++	-
BL13		+++	++	+
BL14		++	-	-
BL15		+++	++	+
BL16		-	-	-
BL17		+++	+	+
BL18		+++	+++	+
BL19		-	-	-
BL20		+++	+++	+

L'absence de la zones (-), une zones d'inhibition faible (+), une zone moyenne (++) et une zone d'activité importante ou fort (+++).

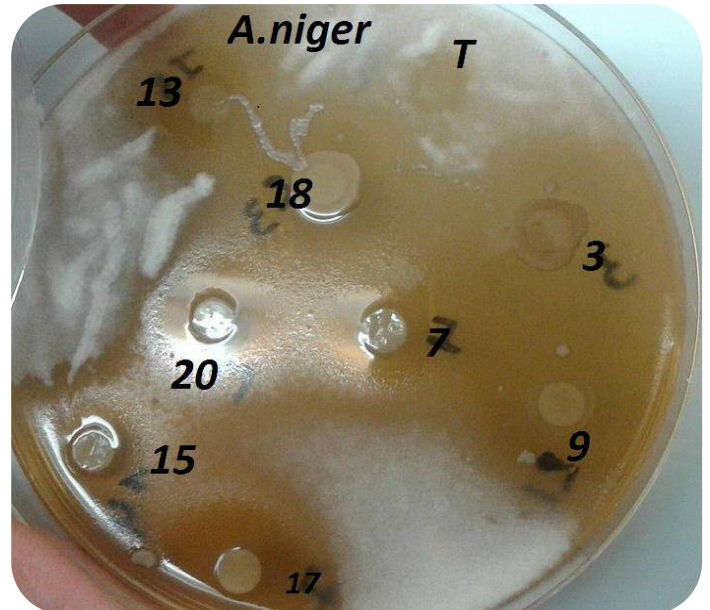
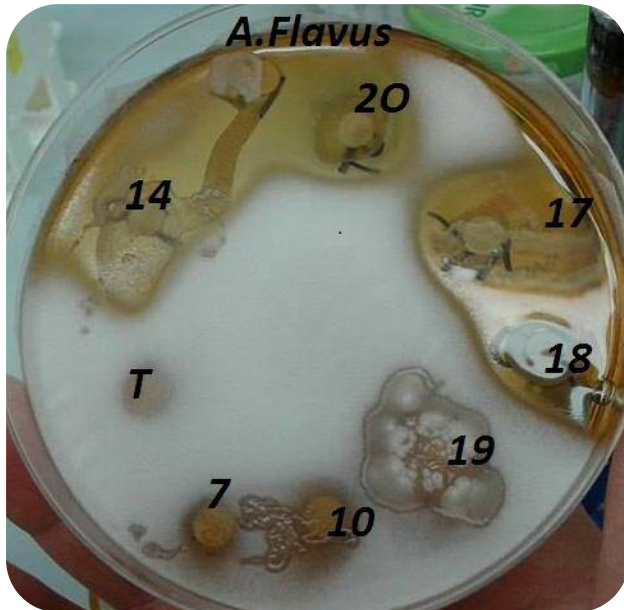


Photo 7,8 et 9 : Antagonisme vis à vis d'*Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* et *Penicillium sp*



*Conclusion et
perspective*

L'objectif principal de notre travail est d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques à partir d'échantillons de fromage traditionnels *bouhazza* produit localement, dans le but final est d'étudier l'antagonisme contre des souches bactériennes et fongiques impliquées dans les toxi-infections et altérations alimentaires.

La microflore dominante de *bouhazza*, est formée essentiellement de BL. Les tests macroscopiques et microscopiques de la flore lactique du fromage *Bouhazza* nous ont permis de sélectionner 38 isolats, présentant des caractères similaires aux bactéries lactiques (Gram+, catalase-). 20 isolats sur les 38 présélectionnés sont retenus pour l'identification et la caractérisation partielle en utilisant différents test phénotypiques et biochimiques. En se basant sur les les critères mentionnés par Bourgeois et Larpent (1996) et en comparant avec les résultats des tests de l'identification partielle de la flore lactique du fromage *bouhezza*, les 20 isolats lactiques sont assignés aux genres : *Lactococcus sp.* , *Leuconostoc sp.* et *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.* et *streptococcus*. Des isolats de ces genres sont fréquemment isolés, en association ou non, à partir de ce type de fromages traditionnels.

L'étude de l'antagonisme antibactérien, des 20 isolats sélectionnés, contre 4 souches Gram positif et 4 souches Gram négatif à montré que 6 isolats ; BL9, BL11, BL13, BL17, BL18 et BL20 ont une activité contre *Echerichia coli*, *Listeria monocytogenese* et *Staphulococcus aureus* . Parmi ces 9 isolats BL 17, BL 18 et BL 20 ont montré les plus grandes zones d'inhibitions. Leur activité antibactérienne à été confirmée par la méthode des puits.

Dans la présente étude 9 isolats sur un total de 20 isolats de BL testés (20-18-17-15-13-12-10-9-8) ont montré une activité antifongique prometteuse, basée sur l'apparition d'une zone d'inhibition formée autour des disques, notamment contre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.

Cette étude sur le fromage *Bouhazza*, a permis d'atteindre les objectifs fixés au départ, à savoir l'isolement de la flore lactique dominante, sa caractérisation partielle, et la mise en évidence de activités antimicrobiennes des isolats de BL sélectionnés .

En effet, plusieurs perspectives pourraient être envisagées afin d'approfondir les connaissances sur ces substances anti microbiennes produites par les BL du fromage

Bouhazza :

- purification et caractérisation des molécules protéiques
- tester le potentiel bio conservateur des BL qui ont présentés des fortes activités antifongiques et antibactériennes.



Résumé

Abstract

Insulation and characterization of the lactic bacteria starting from traditional cheese “Bouhezza” and the study of their antagonism

In Algeria, Bouhezza traditional fermented dairy product is often consumed it self in its spawning condition ,or after drying to extend that shelf life. It contains a producing microflora of antimicrobial substances. Lactic acid bacteria are used in the fermentation and organic food preservation with the production of organic acids and other antibacterial substances such as bacteriocins by blocking some pathogenic strains.

Counts of the total mesophilic lactic flora and fauna of traditional dairy products were performed on, MRS were the burden of total mesophilic flora is very high (3×10^6 CFU / g).

In order to demonstrate the inhibitory effect of these bacteria, we studied the antagonistic power of 38 strains isolated (MRS incubated 30°C/24h) from *Bouhezza* overlooked a large number of pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, , *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and champignons : *penicillium*, *A. niger* et *A. flavus*). The recherche of bacterial antagoniste was carried out according to the methode of double-lyers and the methode of wells diffusion. Their interactions have led to the appearance of significant inhibition zone.

The identification and the characteristics of strains the revealed that they belong to the kind : *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Entérocooccus*, *Pediococcus* and *Streptococcus*.

Keywords: *Bouhezza*, lactic acid bacteria, Antagonism. pathogenic bacteria.

ملخص

عزل وتوصيف بكتيريا حمض اللاكتيك من الجبن التقليدي بوهزة ودراسة النشاط المضاد للجراثيم

في الجزائر، يعتبر بوهزة منتج لبنّي تقليدي حيث يتم استهلاكه إما طازجا، أو بعد التجفيف لتمديد مدة صلاحيته و حفظه . أنه يحتوي على البكتيريا المنتجة للمواد المضادة للميكروبات. وتستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك في التخمير وحفظ من المواد الغذائية عن طريق إنتاج الأحماض العضوية والمواد المضادة للبكتيريا أخرى مثل bacteriocins عن طريق تثبيط بعض السلالات المسببة للأمراض.

تم إحصاء و عد كل الميكروبات الموجودة في منتجات الألبان التقليدية بوهزة في الوسط MRS (المحتضنة في درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة H24), حيث كانت مرتفعة جدا تصل حتى $(3 \times 10^6 \text{ UFC/g})$. من أجل إظهار تأثير كابت بشكل خاص من هذه البكتيريا، درسنا قوة معادية من 38 سلالة معزولة من منتجات بوهزة وجها لوجه لعدة عدة سلالات مسببة للأمراض : *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et des champignons : *penicillium*, *A. niger* et *A. flavus*

وقد أدى النشاط البكتيري وفقا لطريقة الطبقات المزدوجة وانتشار الأبار. وقد أدت تفاعلاتها إلى ظهور منطقة تثبيط كبيرة. كشف هوية وخصائص السلالات التي تنتمي إلى أجناس :

:*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* *Entérocooccus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*

كلمات مفتاحية : بوهزة , البكتيريا اللاكتيكية , الحفظ , النشاط البكتيري



*Références
bibliographiques*

A

ABEE T., KROCKEL L et Hill C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food préservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169-185.

ABDELAZIZ S., AIT KACI F.1992. Contribution à l'étude physico-chimique et microbiologique d'un fromage traditionnel algérien fabriqué à partir du lait de chèvre le "Djben". Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Institut national agronomique d'El Harrach, Alger. 67 p.

ABID Z .2015. Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «Jben» page32-34.

ADAMS M.R et MARTEAU P. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 263-264.

AGUIRRE M ET COLLINS M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107

AISSAOUI Z O. 2004. Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle Algérien « Bouhezza ». *Mémoire de Magister.* Université Mentouri de Constantine. 134p.

AISSAOUI ZI .2011. *J. Food, Agric. & Environ.* 9:96-100.

AISSAOUI ZI., PEDILIGGIERI C., BENATALLAH L., LORTAL S., LICITRA G., ZIDOUNE M.N., et CARPINO S. 2012. Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture & Environement* Vol. 10 (2): 289-295.

ALLOUCHE FELLA NAOUL., AMINA HELLAL., ABDENOUR LARABA.2010.Etude de l'activité antimicribiene des souches de lactobacillus thermochiles utilisé dans l'industrie laitière.Revue. « Nature et technologie ».N°02/juin 2010.page 13 à 20.

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 : 138-146.

AXELSSON ,2004 lactic acid bacteria : Classification and physiology.in lactic acid bacteria.microbiology and fictional aspect .New york.marcel dakeer.Inc page 1-66

AXELSSON, L. 2005. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York.

B

BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI, N., GUETARNI, D., KIHAL, M., OUZROUT, R. 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, **23**: 30-37.

BETTACHE G., ADJOU DJ F., HADADJI M., KIHAL M. 2012. Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a traditional Butter and their major techhnological traits,world applied sciences journal 17(4).pp :480-488.

BELAL JAMAL MUHIALDIN AND ZAITON HASSAN .2011.Department of Science and Technology, University Sains Islam Malaysia Bandar Baru Nilai, 71800 Nilai Negeri Sembilan, Malaysia. *American Journal of Applied Sciences* 8 (5): 447-451, 2011

BELYAGOUBI L. AND ABDELOUAHID D.E. 2013.Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. *Advances in Food Sciences*. 35 (1) :84- 85

BEAL C., SODINI I. 2012. Fabrication des yaourts et des laits fermentés, Techniques de l'Ingénieur f6315, Paris- France, 16 p.

BENMAMMER F., HAMSI, S. 2003. In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingéniorat, Institut de biologie, Université de Tlemcen, Algérie, 73 pages.

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

BOUDJANI W. 2009. Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen, Algérie. Pages 73.

BOUADJAIB Sarah. 2013. Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Page 42-43.

BOURGEOIS C. M., LARPENT J.P. 1996. Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Ed © Technique Documentation Lavoisier, Paris.

BOUTTEFRO Y A., MILLIERE J.B. 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L. monocytogenes* ATCC15313. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 65-75.

BOUZID. 2008. IN BOUDJANI, W. 2009. Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.

BUIST G., VENEMA G., KOK J. 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. *Journal of biotechnology*. N° 22: 5974-5953.

BUCHMAN G. W., S. BANERJEE AND J. N. Hansen .1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*. 263, 31, 16260-6.

C

CHAMPAGNE ,1992. Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

CARBONNELLE B., DENIS F., MANNONIER A., BINON G ET VARGIVER K. 1990. Bactériologie médicale. *Techniques visuelles*, pp.23.

CARMEN M ; JAN KOK, EH ; PELAEZ, C ; REQUENA, T ET BUIST G. 2000. Applied and Environmental Microbiologie, Aug., Pp: 3174-3179.

CALWAERTE R ET VUSYTE L.2000. bacteriocine production with lactobacillus amylocorus dca 471 is improved and stasilised with fed-batch.fermentation appliedand enivermental microbiologie.606-613.

CHERIGUENE A., CHOUGRANI F., BEKADA A ., EL SODA M., BENSOLTANE A. , 2007. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. In African Journal of Biotechnology Vol. 6 (15), PP. 1854-1861.

CHYE F.Y., ABDULLAH A. AND AYOB, M.K. 2004. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol*, 21: 535–541.

CORSETTI A., G. PERPETUINI and R. TOFALO. 2015. Biopreservation effects in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (W. Holzapfel, ed.), pp. 311–332., Woodhead Publishing.

CROWLEY S., J., MAHONY and D. VAN SINDEREN. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 33: 93–109.

D

DELLAGLIO F., DEROISSART H., TORRIANI S., CURK M. C., JANSSENS D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., tech,doc Lavoisier,paris page2.

DALIÉ D.K.D., A.M. DESCHAMPS AND F. RICHARD-FORGET. 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21: 370–380.

DERIOSSART H, B.1986.Les Bactéries lactiques. In-Lait et produits laitiers,Vol. 3. (F.M.Luquet,éd.).Technique et documontation lavoisier,Paris,PP. 343-407.

DELARRAS, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.

DOMANDJI A., HELLAL A., SAIDI N.2010.Purification de la bacteriocine à partir de lactobacillus acidophilus 11.REV.Microbiol.Ind.San et Environn. Vol 4, N°2, P 25-47.

DUONGDEARN SUWANJINDA, CHRIS EAMES, AND WATANALAI PANBANGRED. 2007. by The International Union of Biochemistry and Molecular Biology ,Received for publication, March 9, 2007, and in revised form, May 2, 2007.

DORTU C .2008. Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.

DORTU C., THONART P.2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 143-154 :-12.

DHARAM P ., NARENDER R. P .2007.Indian traditional dairy products: an overview. International Conference on Traditional Dairy Foods. November : 14-17.

E

EL-GHAISH S., AHMADOVA A., HADJI-SFAXI I., EL-MECHERFI K.E., BAZUKYAN I., CHOISSET I., RABESONA H., SITOHY M., POPOV Y. G., KULIEV A., MOZZI, F., CHOBERT J. M., HAERTLE T. 2011. Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* , 22: 509-516

F

F.J.CARR. D. HILL., N.MAID.2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28 : 281-370.

G

GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R. L., BENOMAR N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 51-7.

GEORGALAKI M.D., PAPADELLI M., ANASTASIOU R., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU, E. 2002. Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. *Le Lait*, 82, 657–671.

GILAROVA R., NORRIS J.R. 1994. Techniques in microbial ecology. *Methods in Microbiology*, Vol. 22. Academic Press, London, pp. 627.

GONG H. S., MENG X. C., WANG H. 2010. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Cont.* , 21: 89-96.

GORBACH.L .1969. The discovry of L.GG.Nutrition today, 31 :25-45.

GUIRAUD J. ET GALZEY.P.1980.Analyse micro biologique dans les industries alimentaire.Ed.Lusine nouvelle,Paris,236p.

GUIRAUD J.P. 2003. Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD.

H

HAMMES W. P., AND HERTEL C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes, Vol. (4)*. Springer Science and Business Media. New York, USA. Pp 320-403.

HARIRI A., OUIS N., SAHNOUNI F. ET BOUHADI D., 2009. Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev.Microbiol. Ind. San et Environn. P: 37-55*.

HALLAL A., 2001. Fromages traditionnels algérien. Quel avenir ? Revue agroligne n° 14, Avril- Mai.

HENG N. C. K., WESCOMBE P. A., BURTON J. P., JACK R. W., AND TAGG J. R. 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp45-92.

HSU S T., E., BREUKINK G. BIERBAUM H. G. SAHL B., DE KRUIJFF R., KAPTEIN N. A. VAN NULAND AND A. M. BONVIN .2003. NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 15, 13110-7.

I

IRLINGER F ET MOUNIER J. 2009. Microbial interactions in cheese : Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology.*, 20: 142-148.

J

JACK R. W., J. R. TAGG and B. RAY .1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews.* 59, 2, 171-200.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MADRANT., SCHUCK P et BRULE G., 2008. Les produits laits, *2ème édition TEC et DOC Lavoisier*, 185p

JESPER MAGNUSSON., KATRIN STROM A., STEFAN ROOS A., JORGEN SJOGREN B., JOHAN SCHNURER.2003. First published online 17 January 2003. *FEMS Microbiology Letters* 219 (2003) 129.

JEDIDI H. 2007. Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Thèse de doctorat. 90p.

K

KAMAL-ELDIN. 2012. Fermented Cereal and Legume Products. In *Fermentation: Effects on Food Properties*. CRC Press.

KHALIL R., ELBAHLOUL Y., DJADOUNI F., OMAR, S. 2009. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pak. J. Nutr.* , 8: 242-250.

KOSTINEK M., SPECHT I., VINOD A., EDWARD., ULRICH SCHILLINGER U., HERTEL C., WILHELM H., HOLZAPFEL., CHARLES M. A. P., FRANZA. 2006. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 527–540.

KLEIN G., PACK A., BONAPARTE, C., AND REUTER, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 41: 103-125.

KLAENHAMMER T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12: 39-85.

KRIEG N.R. 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria(–) Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity, G. M., Boone D. R., Castenholz, R. W. Williams and Wilkins, Baltimore .721: 33–38.

L

LUQUET F.M. ., CORRIEU G. 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.

M

MAKHLOUFI K. 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactériolactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat de .L'univ Pierre et Marie Curie .228 P.

MAMI A., HENNI J. E., KIHAL, M. 2008. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci* . 3: 39-49.

MANDAL V., S.K. SEN and N.C. MANDAL. 2013. Production and partial characterisation of an inducer-dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 2445–2453.

MARTH E. H. ET STEELE, J. L. 2001. *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.

MAYO B., T. ALEKSANDRZAK – PIEKARCZYK., M. FERNANDEZ., M. KOWALCZYK., P. ALVAREZ-MARTIN, ET J. BARDOWSKI. 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* Blackwell Publishing 3- 34.

MARCHAL N., BOURDON J.L., RICHARD, C.L. 1991. *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. 3^{ème} Ed. , Doin éditeurs, Paris.

MCLEOD A., NYQUIST, O. L., SNIPEN L., NATERSTAD K., AXELSSON, L. 2008. Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol*, 31(5): 393–403.

MECHAI A. ET KIRANE D. 2008. Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raïb”. *African Journal of Biotechnology*, 7 (16) : 2908-2914.

MEKENTICHI Z. 2003. *Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (Bouhezza).mémoired'ingénieur*. Dept Agronomie. Université de Batna. Algérie.

MENNANE Z., KHEDID K., ZINEDINE A., LAGZOULI M., OUHSSINE M., ELYACHIOUI, M. 2007. Microbial characteristics of Klila and Jben traditional.

MKRTCHYAN H., GIBBONS S., HEIDELBERGER S., ZLOH M., LIMAKI H.K. 2010. Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.

MORISSET D.2002. Etude des relations structure/fonction d'une bactériocine anti- *Listeria*, la méésentéricine Y105. These de Doctorat. Univ de Poitiers U.F.R. 247 P

MORONI O .2007. Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Lesteria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.146p.

N

.NAGHMOUCHI K., BELGUESMIA Y., BAAH J., TEATHER J., DRIDER, J. 2010. ANTIBACTERIAL activity of class I and IIa bacteriocins combined with Polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162: 99-107.

NIGUTOVA K L., SERENCOV, M. ; PIKNOVA P., JAVORSKY AND P PRISTAS .2008. Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 60, 1, 20-4.

NILSEN T., I. F. NES AND H. HOLO .2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5, 2975-84.

O

OLIVEIRA P.M., E ZANNINI AND E.K. ARENDT. 2014. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology* 37: 78–95.

OUADGHIRI M. 2009. Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «L'ben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc. 132 p.

OUARDA AISSAOUI ZITOUN .2014.Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « *Bouhezza* ».page 82.

P

PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS N., LITOPLOULOU-TZANETAKI E., KOTZEKIDOU P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65,859– 867.

POZNANSKI E., CAVAZZA A., CAPPA F. AND COCCONCELLI, P. S. 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol*, 92: 141–151.

PRISCILIA Y., HEREDIA-CASTRO., JOSE I. MENDEZ-ROMERO., ADRIAN HERNANDEZ-MENDOZA., EVELIA ACEDO-FELIX., AARON F. GONZALEZ-CORDOVA., AND BELINDA VALLEJO-CORDOBA.2015. *J. Dairy Sci.* © American Dairy Science Association®. 98:1–9.

R

RAYNAUD S .2006.regulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*.N° d'ordre : 826 page : 309 réalité de la dépendence.option méditerranées :Serie B.Etude et recherche ;n.14 p.229-238.

RODGERS S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures.. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 276-284.

RODRIGUES. 2002. Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Pages 73.

RODGERS S. 2004. Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 366-372.

S

SAAD NAIMA, 2010. Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche *in vitro*, thèse doc. Ecole doctorale Biologie Santé Fac des Sciences et Techniques. Univ de Limoges.

SALMINEN S., WRIGHT A. V., OUWEHAND A. 2004. Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.page 2.

SCHÖBITZ R., SUAZO V., COSTA M. et CIAMPI L. 2003. Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 237-244.

SAVADOGO A., OUATTARA1 C.A.T., SAVADOGO P.W., OUATTARA1 A.S. BARRO N., TRAORE, A.S. 2004. Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (2): 134-139.

T

TABAK S. 2007. Interactions entre *Helicobacter pylori* responsable de maladies gastroduodénales et Bifidobacteries. Mémoire de magister, Université d'Oran.

TABASCO R., GARCIA-CAYUELA T., PELAEZ C., REQUENA, T.2009. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 132: 109-116.

THOMPSON J., GENTRY-WEEKS C.R. 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 239-290.

TOUATI K., 1990. Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique d'un fromage artisanal Algérien « La Klila ». Mémoire d'ingénieur, *Université Mentouri Constantine*, 83p.

V

VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERSTERS K., SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60: 407–438.

VANDANA BHARTI^{a*}, ARCHANA MEHTA^a, SIDDHARTHA SINGH^a, NEHA JAIN^a, LAXMI AHIRWAL^a, SUCHI MEHTA^b.2015. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences *Received: 30 Apr 2015 Revised and Accepted: 06 Jul 2015*.

VERMEIREN L., DEVLIEGHERE F., DE GRAEF V. AND DEBEVERE, J. 2005. In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* 98, 33-42.

Y

YATEEM A., BALBA M. T., AL-SURRAYAI T., AL-MUTAIRI B., AL-DAHER R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* , 3: 194-199.

YOUSEF I., HASSAN, LLOYD B., BULLERMAN .2008. Food Science and Technology Department, University of Nebraska-Lincoln, 349 Food Industry Complex, Lincoln, USA
Received 30 October 2006; received in revised form 24 August 2007; accepted 2 November 2007. International Journal of Food Microbiology 112–115

Z

ZAIDI O., ZERTAL M. et ZIDOUNE M.N. 2000. Présentation d'un fromage traditionnel bouhezza. *Journal Algérien de Médecine.*, 2: 96-101.

ZERGOUNE FATMA.2015.la sélection des souches des bactéries lactique proteolitique isolées partire d'un produit laitier fermenté artisanal à base de lait de vache « j'ben » 25-26.

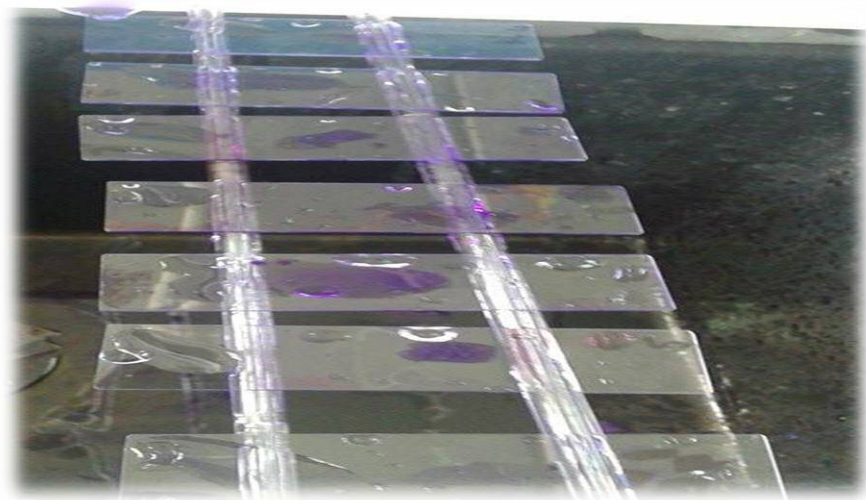


Annexes

Annexe 1: Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram(+) absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram(-) qui apparaissent distinctement rosâtres.



Annexe 2: l'eau peptoné

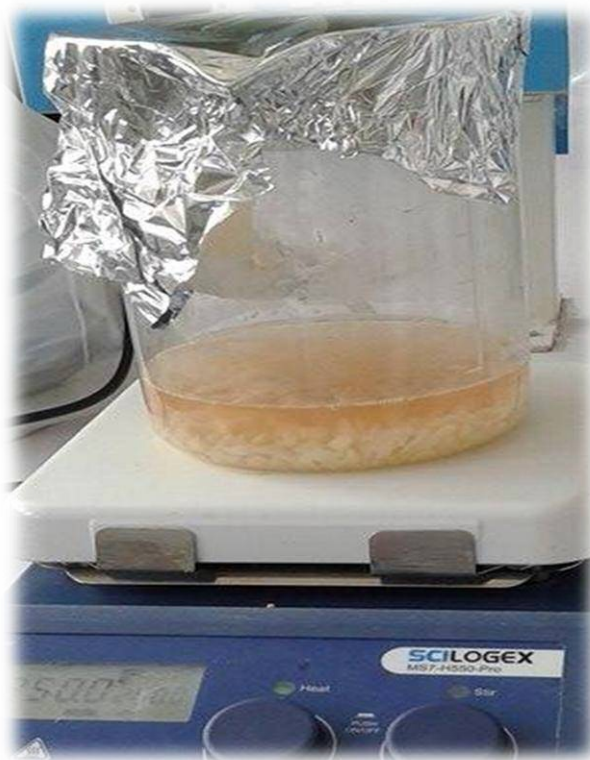
1000 ml de l'eau physiologique stérile (0,9% de NaCl,) additionnée de peptone (0.1%,)

Annexe 3 : Clarck & Lubs

* dextrose.....	20 g/l
* peptone.....	5 g
* glucose.....	5 g
* hudrogénophosphate de potassium.....	5 g
* d'eau distillée.....	1 L
* PH	7,5

Annexe 4: milieu PDA

* de pomme de terre.....	100 g
* agar	10 g
* glucose.....	10 g
* eau distillé.....	500 ml



Annexe 5 : Gélose nutritive

* Hydrolysate tryptique de caséine	2,5 g
* Extrait de viande	5 g
* Glucose.....	1 g
* Extrait de la levure.....	2,5 g
* Agar.....	15 g
* Eau distillé.....	1000 ml
* PH.....	7à 37°C

Annexe 6 : Mueller Hinton

* Infusion de viande de boeuf	2g
* Amidon.....	15 g
* Hydrolysate de caséine	17g
* Agar.....	17 g
* Eau distillée.....	1000 ml
* pH	7,3

Annexe 7 : Eau physiologie

* NaCl.....	9g
* Eau distillée	1000 ml

Annexe 8 : Solution de tween

1 ml de tween dans 100 ml d'eau distillée.

Annexe 9 : composition de VP

* peptone tryptique de viande.....	6g
* glucose.....	5g
* K ₂ HPO ₄	45g
* eau distillée.....	1 litre
* pH	7

Annexe 10 : les matérielles utilisées.



Figure N°1 : autoclave



Figure N°2 : la chromatographie

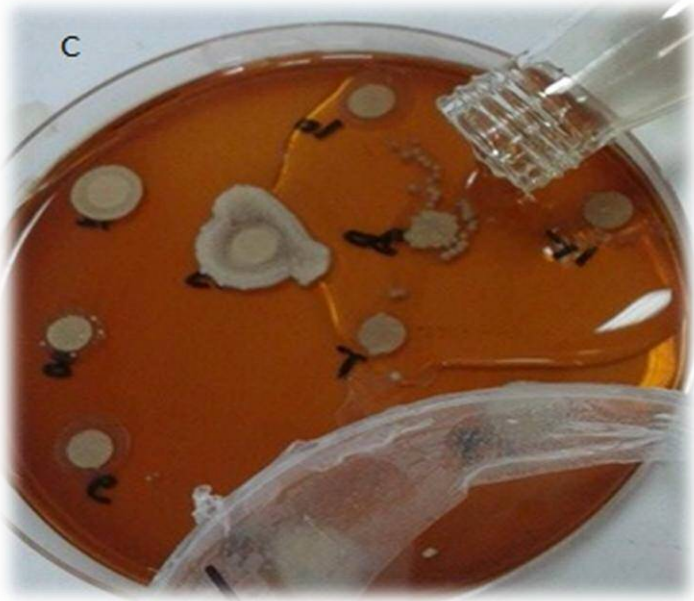
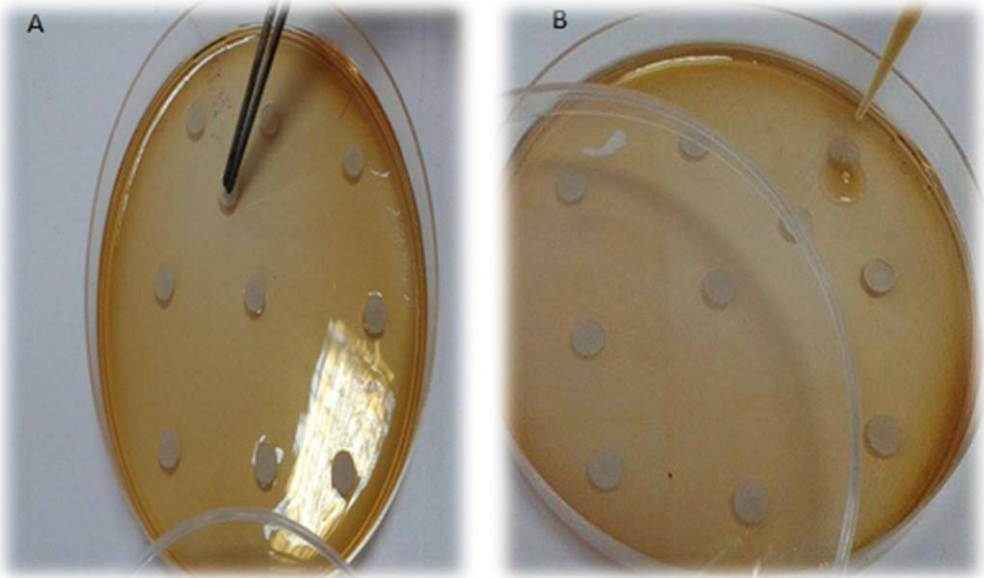


Figure N°3 : Etuve

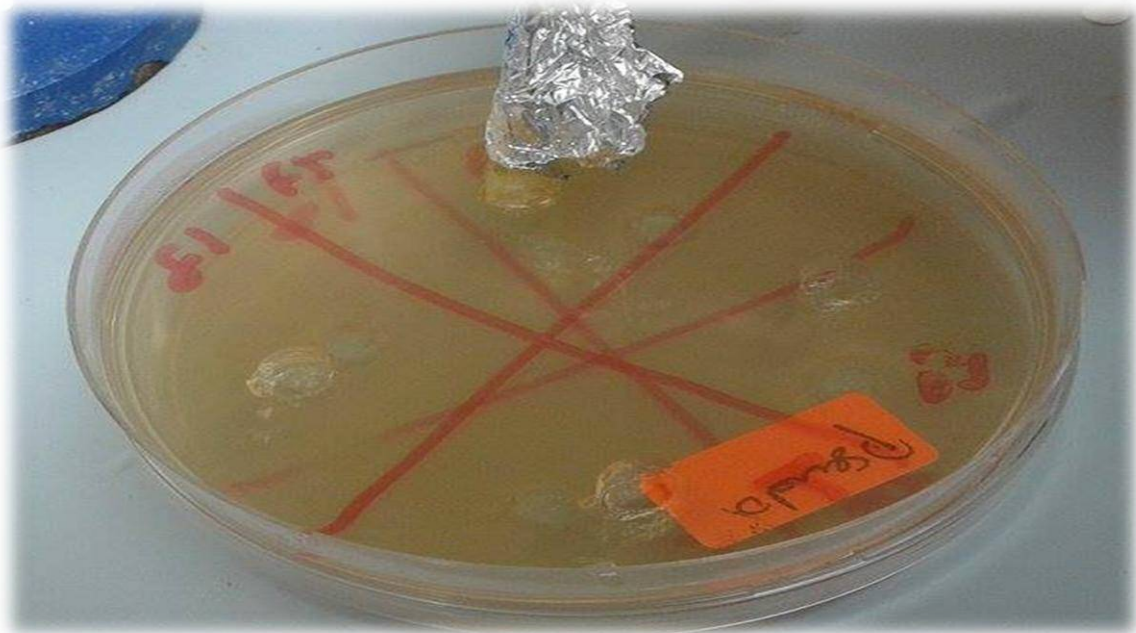


Figure N°4 : la hote.

Annexes 11 : photos de teste de préselection



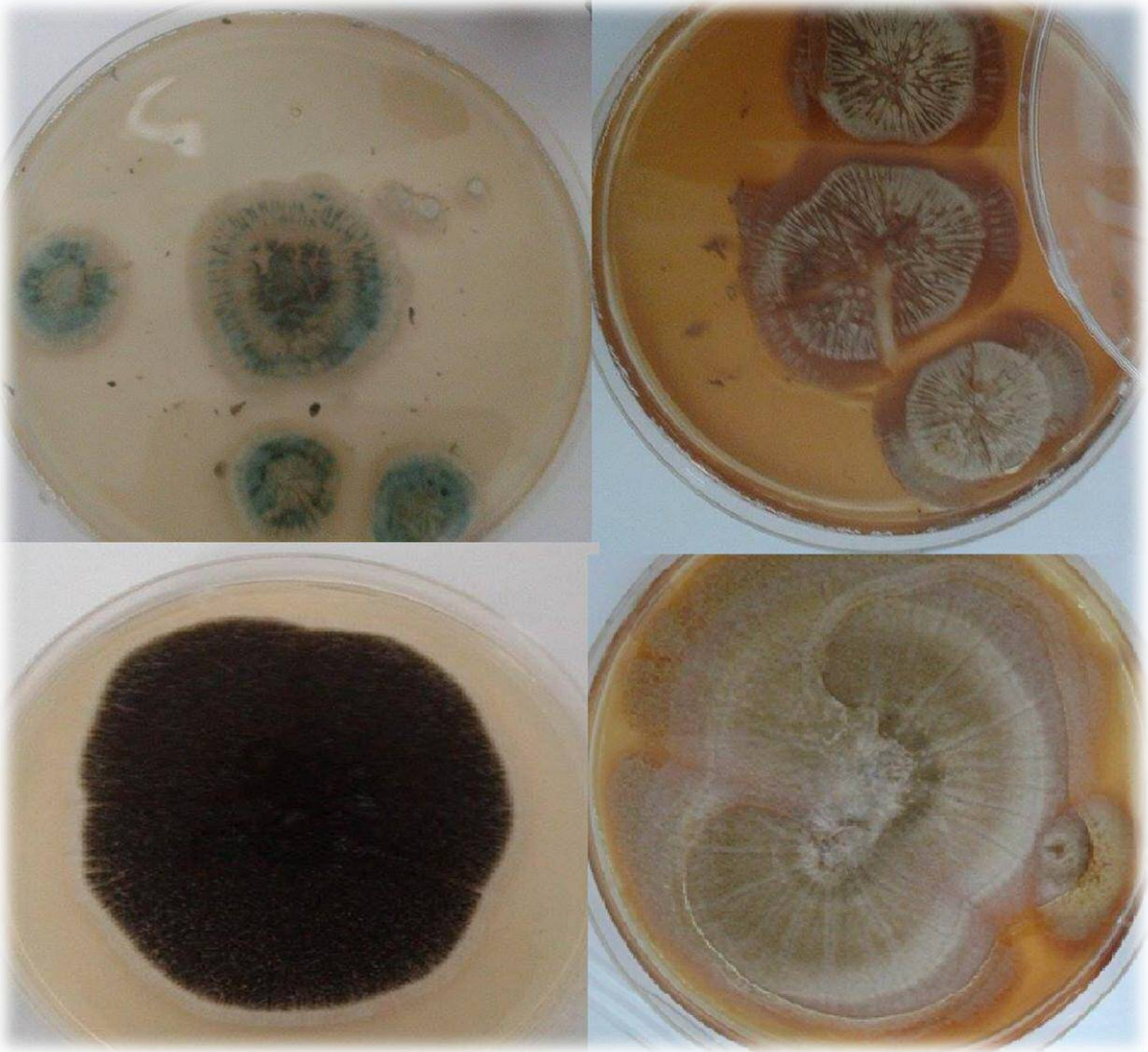
Annexe 12 : méthode des puits



Annexe 13 : La jarre d'anaérobiose



Annexe14 : Préparation de solution des spores fongiques



Nom : **ZOUGAGH**
Nom : **FAHLOUL**

Prénom : **YASMINE**
Prénom : **WAHIBA**

Date de soutenance : 05/06/2016

Master Académique en Biologie Option Microbiologie

Isolement et caractérisation des Bactéries lactiques à partir d'un ferment traditionnel *Bouhazza* et étude de leur antagonisme

Résumé

En Algérie, de nombreux types de fromages traditionnels de différentes régions du pays sont actuellement produits au niveau des ménages ou de façon artisanale. *Bouhezza* est un exemple de ces fromages fabriqué et affiné dans des sacs de peau animale (chèvre ou brebis) appelés communément *Chekoua*. Son écosystème est dominé par la flore lactique indigène. L'objectif principal de notre travail est d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques à partir d'échantillons de fromage traditionnels *bouhazza* produit localement, dans le but final est d'étudier l'antagonisme contre des souches bactériennes et fongiques impliquées dans les toxi-infections et altérations alimentaires.

Des dénombrements de la flore mésophile totale et de la flore lactique de ce produit laitier traditionnel ont été effectués sur les milieux MRS, où la charge de la flore mésophile totale est estimée à 3×10^6 UFC/g. 38 isolats sont sélectionnés, présentant des caractères similaires aux bactéries lactiques (Gram+, catalase-). 20 isolats sur les 38 sont retenus pour l'identification et la caractérisation partielle. Les 20 isolats sont assignés aux genres: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Entérocooccus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

L'étude de l'antagonisme antibactérien, des 20 isolats sélectionnés, contre 4 souches Gram positif et 4 souches Gram négatif à montré que 6 isolats ; BL9, BL11, BL13, BL17, BL18 et BL20 ont une activité contre *E.coli*, *L. monocytogenese* et *S. aureus*. Parmi ces 9 isolats BL 17 ; BL 18 et BL 20 ont montré les plus grandes zones d'inhibitions. Leur activité antibactérienne à été confirmée par la méthode des puits. Dans la présente étude, 9 isolats sur un total de 20 isolats de BL testées (20-18-17-15-13-12-10-9-8) ont montré une activité antifongique prometteuse, basée sur l'apparition d'une zone d'inhibition formée autour des disques, notamment contre *A. flavus* et *A. niger*.

Mots clés : *Bouhazza*, Bactéries lactiques, biopréservation, Antagonisme, fermentation, Bactéries pathogènes.

DEVANT LE JURY :

Présidente : Dr. Derouiche Faouzia

MCA

Univ.Abes Laghrour-Khanchella

Encadreure : Dr.Merabti Ryma

MCA

Univ.Abes Laghrour-Khanchella

Examinatrice: Mm.Sbihi Fatima

MAA

Univ.Abes Laghrour-Khanchella

2015-2016