

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaires.



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية

وعلوم التغذية.

Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement et sélection de souches de bactéries lactiques à effet probiotique

Membre de jury

Présidente : M^{me}. AMIRA Samia

Examineur : Mr. RAHMOUNE Yazid

Encadreur : Dr. AIT MEDDOUR Amel

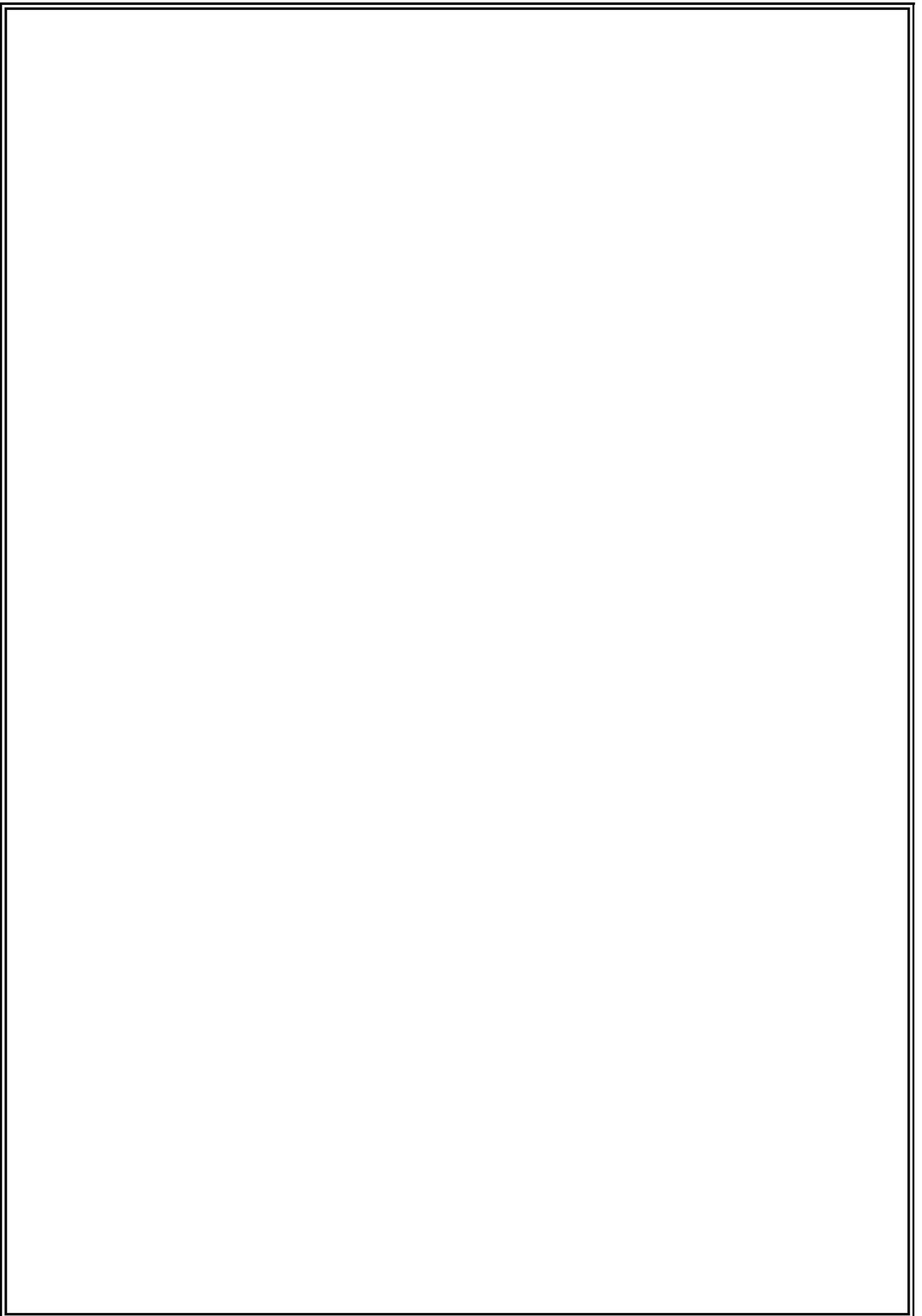
Présenté par

M^{elle} AZIZI Hadjer

M^{elle} BOUCHICHA Asma

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d' ordre (bibliothèque)



Remerciements

*Ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'université Mohamed Sadjik Ben Yahia, Jijel, dirigé par **Dr Ait Meddour A.***

*Tous d'abord, nous adressons une profonde reconnaissance au **Dr Ait Meddour Amel**, maître de conférences à l'université de Jijel pour la formation qu'elle nous a assuré. On la remercie pour le temps qu'elle nous a consacré tout au long de cette période.*

On souhaite témoigner nos remerciements tout aussi sincères aux membres de jury :

***Mme Amira**, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.*

*On est honoré par la participation de **Mr Rahmoune** en acceptant d'examiner la qualité de ce travail.*

Nous remercions tous les enseignants du département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires qui nous ont apporté un soutien moral, des suggestions et des conseils précieux.

Nous avons le plaisir de remercier tous les techniciens du laboratoire de microbiologie.

Dédicace

Ce travail est dédié à

Mes parents, et je tiens à leur présenter mes reconnaissances et mes remerciements. Ils n'ont jamais cessé de me soutenir pour que je puisse finir mes études et avoir une bonne formation et surtout être la meilleure.

*Mon frère **Ziad**, décédé trop tôt, qui m'est le père et la mère, la source de mes joies et le secret de ma force. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

Je ne saurais oublier de remercier toutes les personnes qui me sont chères, en particulier mes amis (es) et mon oncle.

Merci aussi à tous ceux qui ont consacré du temps, de l'énergie et de la patience.

Hadjer

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chères sœurs, Mereïme, Hasna, Fatïma, Soulef et Djana pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mes chers frères, Mohamed, Khaled, Oussama et Adem, pour leur appui et leur encouragement.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Asma

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

I. Les probiotiques.....2

I.1. Historique et définition2

I.2. Principaux microorganismes probiotiques.....2

I.3. Comment sélectionner une souche probiotique..... 2

II. Utilisation des bactéries lactiques comme probiotiques.....3

II.1. Définition des bactéries lactiques.....3

II.2. Principales caractéristiques.....4

II.3. Taxonomies et classification.....4

II.4. Effets bénéfiques sur la santé humaine.....6

Matériel et méthodes

1. Isolement de souches de bactéries lactiques8

1.1. Provenance des échantillons.....8

1.2. Isolement.....8

2. Purification.....8

3. Préparation des *inocula* standards.....8

4. Origine des souches pathogènes.....9

5. Test d'activité antibactérienne.....9

5.1. Test des spots.....9

5.2. Test des puits.....10

6. Tolérance aux pH.....11

7. Tolérance aux sels biliaries..... 11

8. Adhésion sur microplaque en polystyrène.....11

9. Identification des isolats criblés.....12

10. Critères de sécurité des souches d'*Enterococcus*.....14

10.1. Test de résistance à la vancomycine.....	14
10.2. Test d'hémolyse.....	14

Résultats et discussion

1. Isolement de souches de bactéries lactiques	15
2. Standardisation des <i>inocula</i>	15
3. Vérification de la pureté des souches pathogènes.....	15
4. Test d'activité antibactérienne.....	16
4.1. Test des spots.....	16
4.2. Test des puits.....	17
5. Tolérance aux pH.....	19
6. Tolérance aux sels biliaires.....	19
7. Adhésion sur microplaque en polystyrène.....	20
8. Identification des isolats criblés.....	21
9. Critères de sécurité des souches d' <i>Enterococcus</i>	23
9.1. Test de résistance à la vancomycine.....	23
9.2. Test d'hémolyse.....	24
Conclusion	26

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
1	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	5
2	Schéma représentatif du test des puits	10
3	Activité antibactérienne de l'isolat S20 à l'égard de <i>S. aureus</i> (A) et à l'égard de <i>P. aeruginosa</i> (B) révélée par le test de spots	16
4	Activité antibactérienne des isolats S18 et S15 à l'égard de <i>S. aureus</i> (A) et de l'isolat S20 à l'égard de <i>P. aeruginosa</i> (B) révélée par le test des puits	18
5	Isolats lactiques résistants aux sels biliaires : 0,3% (A) et 1% (B)	19
6	Valeurs d'absorbance à 570 nm enregistrées par les isolats lactiques	20
7	Adhésion bactérienne dans des microplaques de polystyrène de 96 puits après coloration au cristal violet, (A) : pas d'adhésion, (B) : forte adhésion, (C) : adhésion modérée et (D) : faible adhésion	21
8	Exemple de la sensibilité à la vancomycine par les souches d' <i>Enterococcus</i>	24
9	Absence d'hémolyse chez les souches d' <i>Enterococcus</i>	24

Liste des tableaux

Figure n°	Titre	Page
I	Test d'identification des isolats lactiques	13
II	Vérification de la pureté des souches pathogènes	16
III	Classification de l'adhésion bactérienne	21
IV	Identification phénotypique des isolats lactiques	22

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléiques

ADH : Arginine di-hydrolase

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

B : *Bifidobacterium*

EMP : Embden Meyerhof –voie Parnas

IgE : Immunoglobuline E

Lb : *Lactobacillus*

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

OMS : Organisation Mondiale de Santé

P : *Pseudomonas*

VP : Vogues Proskauer

S : *Staphylococcus*

Str : *Streptococcus*

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées (**Dridier et Prévost, 2006**). On les trouve essentiellement dans les produits laitiers (yaourt, fromage, lben...), mais aussi dans d'autres niches écologiques en étant seules ou en association avec d'autres microorganismes bénéfiques comme les levures (**Novel, 1993**). Elles sont utilisées de différentes manières, on cite les ferments ou les starters de fermentation (**Mugula et al., 2003**), les agents de bioconservation (**Vermeirenet al., 2004**), et les probiotiques (**Fuller, 1989**). Les aliments fonctionnels dans lesquels sont incorporées des bactéries lactiques probiotiques connaissent depuis une dizaine d'années un très gros essor commercial (**Mugula et al., 2003**).

Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes vivants qui une fois ingérés en quantités adéquates exercent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (**OMS, 2001**).

Ces effets positifs sont le soulagement des maladies d'origine digestive (comme l'intolérance au lactose), l'amélioration du transit intestinal, la prévention de certaines maladies comme l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang, les diarrhées, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ainsi que d'autres infections d'origine microbienne (infections à *Clostridium difficile* et à *Campylobacter*) (**Rastall et al., 2005**).

Le criblage d'un grand nombre de bactéries pour identifier des souches probiotiques est de plus en plus effectué du fait de la demande accrue en nouvelles souches probiotiques pour le développement de nouveaux produits probiotiques par les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (**Motyl et al., 2009**).

Dans le cadre de choisir des bactéries qui ont un effet bénéfique sur l'Homme, notre étude a été consacrée, à isoler des bactéries lactiques à partir du lait cru de chèvre et à étudier leurs propriétés probiotiques.

I. Les probiotiques

I.1. Historique et définition

Au début des années 1900, Pasteur a identifié les microorganismes responsables du processus de fermentation, alors que Metchnikoff a d'abord essayé de découvrir l'effet possible de ces microorganismes sur la santé humaine. Il a associé la longévité accrue des populations rurales bulgares à la consommation régulière de produits laitiers fermentés tels que le yaourt. Metchnikoff considérait les lactobacilles comme des probiotiques (**Gasbarrini et al., 2016**).

Le terme probiotique, a été utilisé pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965 pour le décrire comme étant des substances sécrétées par des microorganismes qui stimulent la croissance d'autres microorganismes (**Lilly et Stillwell, 1965**).

Parker en 1974 a défini les probiotiques comme organismes et substances qui contribuent à l'équilibre microbien intestinal (**Parker, 1974**).

Fuller a tenté en 1989 d'améliorer la définition de probiotique de Parker avec la distinction suivante : « Un complément alimentaire microbien vivant qui affecte avantageusement l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal » (**Fuller, 1989**).

Aujourd'hui, selon la définition adoptée par l'OMS, les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, une fois administrés en quantité adéquate, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

I.2. Principaux microorganismes probiotiques

Les microorganismes probiotiques sont en majorité des bactéries lactiques, utilisées dans la production des produits lactés fermentés. Les espèces associées aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été signalées comme étant les souches bactériennes les plus utilisées. Les espèces représentatives sont *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *B. lactis*, *B. longum* et *B. bifidum* (**Shi et al., 2016**).

I.3. Comment sélectionner une souche probiotique

Un certain nombre de critères doivent être respectés lors de la sélection d'une souche bactérienne probiotique, d'abord elle doit être identifiée par des techniques phénotypiques et génotypiques, appartenir à la flore commensale et être d'origine humaine. Une importance primordiale étant accordée aux questions de sécurité. Les souches du genre *Lactobacillus* et

Bifidobacterium sont généralement considérées comme sûres du fait de leur utilisation depuis longtemps par l'homme. Il est essentiel de procéder à une évaluation de la sécurité lorsque les probiotiques ne font pas partie des genres *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* (**Leuschner et al., 2010**).

La survie des bactéries dans le tube digestif dépend de leur capacité à tolérer les pH bas. L'estomac et les alentours du transit intestinal ont la plus haute acidité ; par conséquent, il est essentiel d'établir le comportement et le devenir de la bactérie lors du passage (**Ammor et Mayo, 2007**).

Une résistance aux sels biliaires est un facteur important pour la survie des probiotiques car après leur échappement aux conditions acides de l'estomac, les probiotiques doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras (**Ammor et Mayo, 2007 ; Guet al., 2008**).

Une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes, et la production de substances d'intérêt sont aussi nécessaires, les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques (acide lactique, acide acétique et acide formique) le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines (**Djaafaru et al., 1996 ; Labioui et al., 2005**).

Un autre critère de sélection important pour un probiotique est la capacité à adhérer aux tissus de l'hôte, en particulier au mucus intestinal et aux cellules épithéliales, afin de promouvoir des interactions (hôte-bactérie) efficaces (**Ouwehand et Salminen, 2003 ; Forssten et al., 2011**).

Parallèlement, du point de vue technologique la souche probiotique doit posséder plusieurs qualités telles que la facilité à être cultivé, la survie durant le processus de fabrication et la stabilité pendant toute la durée de stockage (**Shi et al., 2016**). Le nombre de cellules viables de probiotiques dans un produit doit être d'au moins 10^6 UFC/ml à la date de péremption indiquée, car la dose efficace minimale recommandée par jour est de 10^8 - 10^9 cellules.

II. Utilisation des bactéries lactiques comme probiotiques

II.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer

certaines caractéristiques organoleptiques (texture, saveur des aliments et production de composés aromatiques) et d'augmenter la durée de conservation (**Labioui et al., 2005 ; Dortu et Thonart, 2009**). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), en acides aminés, en composés organiques (acides lactique et acétique), en enzymes (lactase) et en bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (**Dib et al., 2012**). Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires ; saumurage des légumes, boulangerie, fabrication du vin, saurissage des poissons, et salaisons, etc.

II.2. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de cocci ou de bâtonnets à Gram positif, chimio-organotrophes et ne poussent que dans des milieux complexes (**Schleifer et al., 1995**), ne formant pas de spores, catalase et oxydase négatives, avec une tolérance élevée pour un pH bas (**Mokoena, 2017**). Elles sont anaérobies facultatives, capable de fermenter les glucides pour la production d'énergie et d'acide organiques. La voie métabolique du glucose peut être homofermentaire dans ce cas, deux molécules d'acide lactique sont produites, ou hétérofermentaire les produits de fermentation sont des acides organiques (l'acide lactique...), de l'éthanol et du dioxyde de carbone (**Djadouni et Kihal, 2012**).

Les bactéries lactiques sont également capables de produire de petites substances organiques qui contribuent à l'arôme et confèrent des attributs organoleptiques spécifiques aux produits. Elles libèrent également des métabolites antimicrobiens appelés bactériocines (**Widyastuti et al., 2014**).

II.3. Taxonomies et classification

Au début du XXe siècle, le terme « lactic acid bacteria », a été introduit dans la monographie d'Orla-Jensen (1919), ce qui constitue toujours la base du système de classification actuel (**Liu et al., 2014**).

Les critères de description des bactéries utilisées par Orla-Jensen (1919) incluent des critères phénotypiques comme la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la tolérance au acide, la composition de la paroi cellulaire, la tolérance à la bile, le besoin de facteurs de croissance, la présence de certains enzymes..... (**König et Fröhlich, 2017**).

Des techniques moléculaires telles que l'application de sondes oligonucléotidiques ciblées sur l'ARNr 16 S ou l'ARNr 23S (**Schleifer et al., 1995**) et le séquençage de l'ADNr 16S

ont été développées, permettant une identification plus cohérente (Mokoena, 2017). Selon la classification taxonomique actuelle (Fig. 1) les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordres *Lactobacillales*. Selon le "Bergey's manual of Systematic Bacteriology", les bactéries lactiques sont subdivisées en 6 grandes familles : la famille des "*Lactobacillaceae* » (genre : *Lactobacillus*), la famille des "*Enterococcaceae*" (genre : *Enterococcus*), la famille des "*Streptococcaceae*" (genres : *Streptococcus* et *Lactococcus*), la famille des "*Leuconostocaceae*", la famille "*Aerococcaceae*" et la famille "*Carnobacteriaceae*" (Stiles et Holzapfel, 1997).

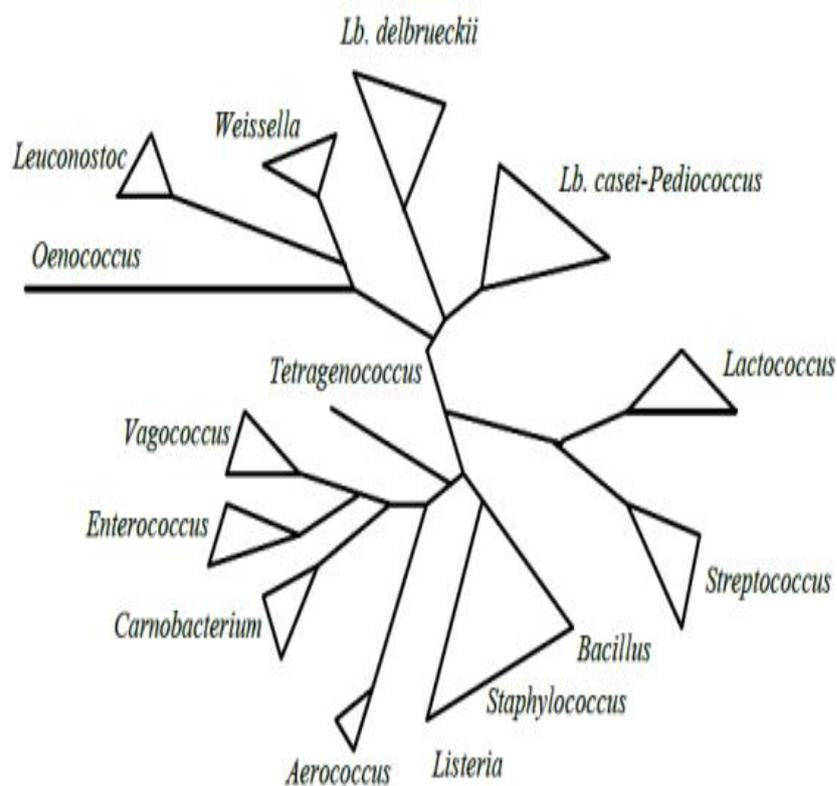


Fig.1.Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Axelsson, 2004)

II.4. Effets bénéfiques sur la santé humaine

Les effets les mieux documentés comprennent les troubles intestinaux tels que l'intolérance au lactose, les diarrhées associées aux antibiotiques et les diarrhées infectieuses (**Villena et al., 2017**).

Plusieurs effets bénéfiques ont été attribués à la consommation de probiotiques lors d'essais cliniques ainsi que de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. Un exemple intéressant est l'application de ces bactéries en tant qu'approche non pharmaceutique pour aider à gérer les troubles métaboliques humaines (**Reis et al., 2017**). Des recherches ont démontré que la consommation régulière de probiotiques pouvait améliorer le profil lipidique sérique, notamment en réduisant les taux de cholestérol sérique par diminution de l'absorption du cholestérol intestinal, déconjugaison des sels biliaires ; modulation du métabolisme lipidique, incorporation ou assimilation de cholestérol dans la membrane bactérienne et inhibition de l'expression des transporteurs intestinaux de cholestérol (**Reis et al., 2017**).

Il a été démontré que la souche *Lb. gasseri* PA-3 pourrait protéger des individus des rats contre les taux sériques élevés d'acide urique et pourrait avoir un effet positif sur la réduction de l'hyperuricémie et la prévention de la goutte (**Yamada et al., 2017**).

Dans une étude, il a été démontré qu'un yaourt fabriqué avec les souches *Lb. Delbrueckii* CRL423 et *Str. thermophilus* CRL412, sélectionnées en fonction de leurs capacités immunomodulatrices ont pu améliorer l'immunité respiratoire et protéger contre l'infection à *Str. pneumoniae* (**Villena et al., 2006**).

Kamiya et al. (2016) ont cherché à évaluer l'activité immunomodulatrice de deux souches bactériennes du yaourt *Lb. delbrueckii* ME-552 et *Str.thermophilus* ME-553, ils ont étudié l'effet des deux souches sur la fonction des lymphocytes T. Les résultats ouvrent la porte à d'intéressantes recherches en vue de mettre au point un yaourt probiotique capable de stimuler la muqueuse qui à son tour excite la couche musculaire sous-jacente (**Kamiya et al., 2016**).

Les probiotiques ont été utilisés non seulement pour améliorer l'immunité, mais également pour moduler l'inflammation excessive ou non productive. De ce fait, les probiotiques ont trouvé une place potentielle dans la gestion des maladies inflammatoires telles que les allergies. Des études ont mis en évidence les effets bénéfiques sur la sensibilisation allergique et

les taux d'IgE, ayant un impact sur l'eczéma, la respiration sifflante et l'asthme (**Gern *et al.*, 2015**).

De nombreuses études ont permis de vérifier l'effet bénéfique des souches probiotiques sous forme de biofilms, notamment une résistance à la température, au pH gastrique et aux forces mécaniques en comparaison avec leurs homologues planctoniques. Il a été montré que la formation de biofilms par les bactéries probiotiques favorise la colonisation de la muqueuse de l'hôte et empêche l'installation des bactéries pathogènes (**Salas-Jara *et al.*, 2016**).

La liste des avantages pour la santé induite par les probiotiques ne se limite pas à ceux mentionnés jusqu'à présent et inclut une gamme d'effets promoteurs. Il est prouvé que les probiotiques pouvant jouer un rôle dans la réduction de l'incidence du cancer par diminution des niveaux d'enzymes cancérigènes générés par la flore colique ainsi qu'en produisant des acides organiques antimutagènes (**Kechagia *et al.*, 2013**).

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Mohamed Sadik Ben Yahia, Jijel.

1. Isolement de souches de bactéries lactiques

1.1. Provenance des échantillons

Les bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru d'une chèvre provenant de la région de Taher qui se trouve à Jijel. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée puis séché avec une lingette stérile du pis de la chèvre, le lait a été recueilli dans 3 flacons stériles (100 ml), puis transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire.

1.2. Isolement

Chaque échantillon a fait l'objet d'un isolement sur milieux spécifiques aux flores ciblées (Tableau 1, annexe II). 1 ml de chaque échantillon a été ensemencé en masse/surface en utilisant de la gélose MRS et M17 (tableau 1 et 2, annexe I), milieux adaptés aux exigences nutritionnelles des bactéries lactiques. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 48/72 h. Après incubation, les colonies ont été sélectionnées sur la base de leurs caractères cultureux (couleur, forme, taille...).

2. Purification

5 colonies caractéristiques ont été prélevées de chaque boîte et purifiées. La purification des isolats a été réalisée par repiquages successifs sur géloses MRS et M17 avec vérification de la pureté des isolats après chaque repiquage en étudiant les caractères cultureux des colonies (même taille, même forme et même couleur...), en effectuant une coloration de Gram (annexe III) et un test de la catalase (annexe III).

3. Préparation des *inocula* standards

Afin de travailler dans des conditions standards, il fallait choisir un *inoculum* fixe. Pour cela, une standardisation des *inocula* s'est avérée indispensable.

Après ensemencement sur gélose MRS et incubation pendant 48 h à 37°C, 3 colonies identiques de chaque culture ont été repiquées dans 9 ml de bouillon MRS. Au bout de 18 h d'incubation, une série de dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-9} a été effectuée et les dilutions 10^{-6} - 10^{-9} ont été ensemencées sur gélose MRS à raison de 3 boîtes par dilution, puis incubées pendant 48 h à 37°C. Au terme de la période d'incubation, les colonies ont été dénombrées en utilisant un compteur de colonies.

4. Origine des souches pathogènes

Les souches pathogènes sont des souches de référence appartenant à deux espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme : un coque à Gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et un bacille à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les souches utilisées font partie de la collection bactérienne du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (université A. Mira-Béjaia). Ces souches ont été conservées dans du bouillon nutritif additionné de glycérol (tableau 3, annexe I) à -18°C. Avant toute utilisation des souches, une revivification et une vérification de leur pureté se sont avérées indispensables. Après quelques repiquages successifs, des tests rapides ont été réalisés:

- Observation microscopique de l'aspect des souches et de leur mode de regroupement après coloration de Gram ;
- Tests de la catalase.

Uniquement, les meilleurs isolats seront retenus ; le choix de ces derniers a été déterminé par l'étude de leur effet probiotique

5. Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des isolats de bactéries lactiques a été mise en évidence par la réalisation de deux tests, ces tests sont les suivants :

5.1. Test des spots

Après avoir coulé les boîtes de Pétri avec de la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5 µl de la suspension bactérienne de chaque isolat lactique (10^8 UFC/ml) ont été déposés en spots. Les boîtes ont été séchées près du bec bunsen puis incubées à 37°C pendant 18 h (**Fernández *et al.*, 2007**). Après la période d'incubation, les boîtes ont été recouvertes de 20 ml d'une gélose PCA en surfusionensemencée avec 1 ml des cultures fraîches des souches cibles (*S. aureus* et *P. aeruginosa* / 10^6 UFC/ml), puis incubées à 37°C pendant 24 h. Au terme de la période d'incubation, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots a été notée. L'inhibition a été notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition a été supérieur à 1 mm (**Schillinger et Lucke, 1989**).

5.2. Test des puits

Pour tester l'activité antibactérienne du surnageant de culture des isolats lactiques à l'égard de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*, des cultures des isolats lactiques (10^8 UFC/ml) préparées dans du bouillon MRS ont été centrifugées à 4000tour/15 min à 4°C. Le surnageant récupéré a été stérilisé par filtration sur une membrane d'acétate de cellulose (0,45 μ m) (Ghraiiri *et al.*, 2008). Après mesure du pH, ce dernier a été testé pour son activité envers les souches pathogènes comme décrit par Barefoot et Kaenhammer, (1983) :

1 ml de la suspension des souches indésirables (10^6 UFC/ml) a été ensemencé en masse dans 20 ml de gélose nutritive. Après solidification de la gélose, des puits de 6 mm de diamètre et de 5 mm de profondeur ont été creusés dans la gélose. Le fond de chaque puits a été scellé avec une goutte de gélose nutritive. Les puits ont été par la suite remplis avec 100 μ l du surnageant natif des isolats lactiques et laissé diffuser pendant 2 h à 4°C. Après cette période, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été révélée par la présence de zones d'inhibition autour des puits (Fig.2). L'inhibition a été notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 1 mm (Schillinger et Lucke, 1989).

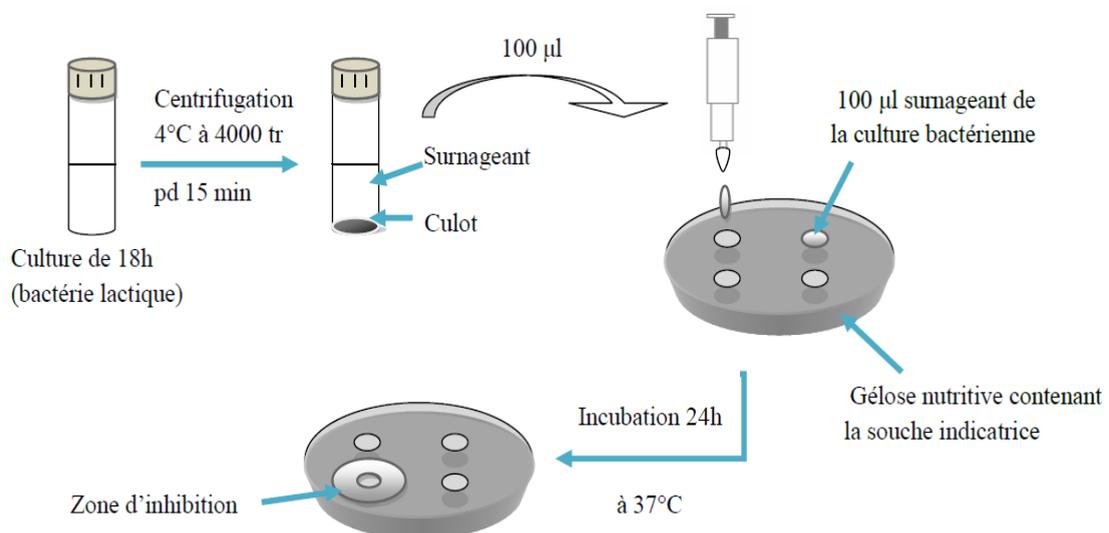


Fig.2. Schéma représentatif du test des puits

▪ **Test des puits après neutralisation du surnageant**

Les isolats lactiques ont été caractérisés quant à la nature de leurs substances antibactériennes. Un ajustement du pH à 6,8 du surnageant de culture afin d'éliminer l'effet du pH et de l'acidité a été réalisé puis le test des puits a été effectué comme décrit en 5.2.

▪ **Test des puits après traitement du surnageant avec une protéase**

L'existence d'une substance de nature protéique est révélée par la disparition ou par la réduction des diamètres des zones d'inhibition après traitement enzymatique. 5 ml du surnageant doté d'activité inhibitrice ont été additionnés d'une solution de pepsine préparée dans du tampon KCl-HCl pH 2 à une concentration finale de 1 mg/ml. Le mélange a été incubé à 37°C/2 h, traité au bain marie à 100°C/5 min puis refroidi brusquement dans un bain de glace afin d'inactiver l'enzyme. Au terme du traitement, le pH des échantillons a été réajusté à la valeur 6,8 (NaOH 2 N) puis testés pour leur activité antibactérienne envers les souches cibles comme décrit précédemment en 5.2.

6. Tolérance aux pH

Dans le but de savoir si les isolats lactiques résistent à différents pH, le test d'effet du pH a été réalisé comme suit : 50 µl de chaque culture d'isolat lactique ont été inoculés dans des tubes de 5 ml de bouillon MRS de trois pH différents, à savoir pH : 3, 4 et 5. L'incubation des tubes a été effectuée à 37°C pendant 24 h (**Tambekar et Bhutada, 2010**).

7. Tolérance aux sels biliaires

Pour savoir si les isolats lactiques résistent à différentes concentrations de sels biliaires, le test suivant a été réalisé : des poids de 0,3 ; 1 et 3 g de sels biliaires ont été pesés. Chaque poids de sels biliaires a été ajouté à 100 ml de gélose MRS en surfusion pour préparer les concentrations : 0,3%, 1% et 3%. Les géloses préparées ont été coulées dans des boîtes de Pétri. 5 µl de chacun des isolats lactiques ont été ensemencés en spots puis laissés sécher. Une fois les boîtes sont sèches, une incubation de 24 h à 37°C a été lancée (**Tambekar et Bhutada, 2010**).

8. Adhésion sur microplaque en polystyrène

Cette étude a été réalisée dans le but d'essayer d'évaluer la capacité des isolats lactiques à adhérer et de former des biofilms. La méthode utilisée est celle décrite par Ait meddour *et al.*(2014) avec quelques modifications.

Après culture des isolats lactique dans le bouillon MRS pendant 24h à 37°C, 200 µl de chaque suspension ont été utilisés pour inoculer les puits d'une microplaque de polystyrène de 96. Cette dernière a été incubée à 37°C pendant 48h. Par la suite, la microplaque a été rincée trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer les cellules non adhérentes. Elle est ensuite séchée en position renversée, puis colorée par 100 µl d'une solution de cristal violet à 1% pendant 30 min. Le cristal violet a été rejeté, et les puits ont été lavés vigoureusement avec l'eau distillée. Ensuite, de l'éthanol à 95% a été additionné. Un volume de 125 µl de chaque puits a été transféré dans une nouvelle microplaque stérile et l'absorbance à 570 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque. Du bouillon MRS stérile a été utilisé en tant que témoin négatif.

9. Identification des isolats criblés

Suite aux tests réalisés, les isolats retenus sont identifiés au niveau du genre en se basant sur leurs caractères morphologiques et divers caractères physiologiques et biochimiques tels qu'indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau I. Tests d'identification des isolats lactiques (Guiraud, 1998)

Test	Protocole	Incubation	Observation
Mobilité	Observation microscopique des cellules bactériennes à l'état frais	/	Présence ou absence de mobilité
Type fermentaire	Des tubes de 9 ml de bouillon MRS, munis de cloches de Durham, ont été ensemencés à raison de 10^8 UFC/ml	37°C/ 24-48 h	Présence ou absence de CO ₂ dans les cloches
Fermentation du lait écrémé stérile	Des tubes de 9 ml de lait écrémé stérile ont été ensemencés à raison de 10^8 UFC/ml	37°C/ 24-48 h	Coagulation ou non du lait écrémé
Thermorésistance	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon MRS ont été chauffées à 60°C/ 30	37°C/ 24-48 h	Présence ou absence de croissance bactérienne après traitement
Croissance à différentes températures	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon MRS ont été incubées à différentes températures	37 et 45°C/24-48 h	Présence ou absence de croissance bactérienne
Croissance à différentes concentrations de NaCl	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon MRS additionné de différentes concentrations de NaCl : 2, 4 et 6% (m/v)	37°C/ 24-48 h	Présence ou absence de croissance bactérienne
Croissance à pH 9,6 et 5,5	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon MRS ajusté à pH 9,6 et à pH 5,5	37°C/ 24 -48 h	Présence ou absence de croissance bactérienne
Dégradation de l'arginine (ADH)	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon Moeller (tableau 4, annexe II) ont été préparées	37°C/ 24 -48 h	Virage ou non de couleur vers le jaune
Production d'acétoïne (VP)	Des cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) dans du bouillon Clark et Lubs (tableau 5, annexe II) ont été préparées	37°C/ 24 -48 h	Virage ou non de couleur vers le rouge après l'ajoute du réactif(VP1 et VP2)

10. Critères de sécurité des souches d'*Enterococcus*

10.1. Test de résistance à la vancomycine

La présence de gènes de résistance à la vancomycine est considérée comme un indicateur de virulence des souches d'entérocoques. Pour cela, la résistance des souches d'*Enterococcus* criblées à cet antibiotique a été testée selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la société française de Microbiologie (**CA-SFM, 2009**). A partir d'une culture fraîche de 18 h, une suspension bactérienne dans 5 ml d'eau physiologique est préparée (concentration de 10^8 UFC/ml à l'échelle 0,5 Mc Farland). Des boîtes contenant du milieu Mueller-Hinton (tableau 6, annexe I) ont étéensemencées par écouvillonnage. Des disques de vancomycine 30 μ g ont été déposés à la surface des boîtes. Après incubation des boîtes à 37°C/24-48 h, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des disques a été notée.

10.2. Test d'hémolyse

Pour le test d'activité hémolytique, les souches d'entérocoques ont étéensemencées en spots à un taux de 10^8 UFC/ml sur une gélose au sang de mouton. Après 48 h d'incubation à 37°C, les géloses sont vérifiées pour une présence ou absence d'une β -hémolyse (zone claire autour des colonies), α -hémolyse (zone verte autour des colonies) et γ -hémolyse (absence de zone autour des colonies) (**Ghraiiri et al., 2008 ; Rivas et al., 2012**).

1. Isolement de souches de bactéries lactiques

Les souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru de chèvre. A partir de 3 échantillons prélevés, 55 isolats bactériens (codés S1-S55) ont été obtenus. Pour l'obtention des isolats lactiques, nous avons opté pour une approche phénotypique basée essentiellement sur l'aspect macroscopique des colonies sur gélose MRS/M17 (petites colonies de couleur transparente, blanchâtre, ou blanc-crème, rondes ou lenticulaires avec un diamètre d'environ 1mm), sur l'aspect microscopique des cellules (cocci, bacilles et coccobacilles à Gram positif) et sur le test de la catalase (catalase négative).

Sur 55 isolats 34 ont été des cocci, des coccobacilles ou des bâtonnets à Gram positif ou à Gram négatif et à catalase positive. Ces derniers ont été exclus de notre sélection du fait qu'ils ne représentent pas le groupe des bactéries lactiques. Les 21 isolats restants ont été à Gram positif et à catalase négative, confirmant leur appartenance au groupe des bactéries lactiques. Parmi ces isolats, 12 ont été sous forme sphérique en paire ou en courte chaîne et 9 isolats ont été sous forme de bâtonnet (bacille).

Les études publiées sur la diversité des microorganismes dans le lait cru de chèvre sont nombreuses. Selon Guiraud (2003), il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. De plus, des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Str. pyogène*, *S. aureus*...).

2. Standardisation des *inocula*

Le but de la standardisation des *inocula*, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes vivantes dans 1 ml de culture durant toute notre étude. Après 18 h d'incubation, le nombre de cellules viables par ml pour chaque culture bactérienne est présenté dans le tableau 2, annexe II.

3. Vérification de la pureté des souches pathogènes

Les souches bactériennes : *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont été utilisées en tant que modèle biologique pour la réalisation de cette étude. Les souches utilisées ont donné les résultats représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II. Vérification de la pureté des souches

Souches	Coloration de Gram	Catalase
<i>S. aureus</i>	Cocci à Gram positif disposés en amas de diamètre ~ 0,5-1 µm	Positive
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilles fins et droits, isolés ou en diplobacilles à Gram négatif de 0,5-0,8 µm de diamètre sur 1,5-3 µm de longueur	Positive

4. Test d'activité antibactérienne

4.1. Test de spots

A travers les résultats du test des spots, tous les isolats lactiques (10^8 UFC/ml) possédaient une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches pathogènes (10^6 UFC/ml). Les zones d'inhibition enregistrées varient entre 2 et 20 mm de diamètre (tableau 3, annexe II). La plus forte activité antimicrobienne a été enregistrée avec l'isolat S20 contre les deux souches pathogènes (*S. aureus* et *P. aeruginosa*) avec une zone d'inhibition de 21 mm de diamètre. Un exemple d'activité antibactérienne révélée par le test des spots est donné sur la Fig. 3.

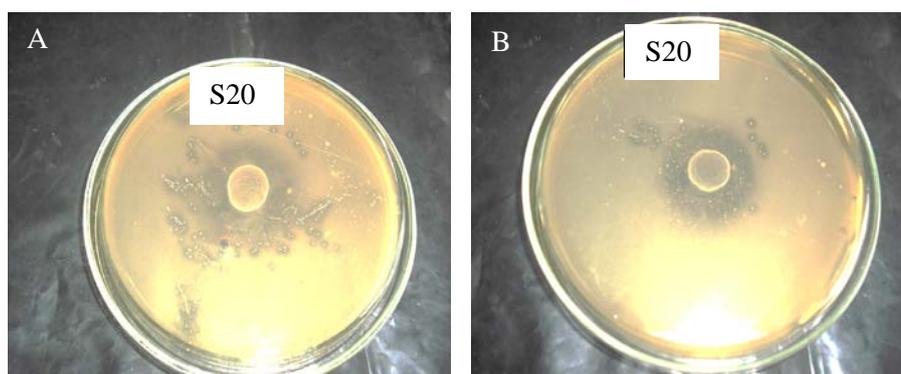


Fig.3. Activité antibactérienne de l'isolat S20 à l'égard de *S. aureus* (A) et à l'égard de *P. aeruginosa* (B) révélée par le test de spots

Selon plusieurs auteurs, l'effet inhibiteur pourrait être attribué à la compétition nutritionnelle et aux métabolites produits par les bactéries lactiques tels que les acides organiques, essentiellement l'acide lactique. De plus, ces bactéries produisent une variété de substances antibactériennes qui peuvent être classées comme des composés à faible poids moléculaire comme le CO₂ et le H₂O₂ et des composés à poids moléculaire élevé telles que les bactériocines (**Settanni et Corsetti, 2008 ; Muñoz et al., 2011**). Ces dernières sont devenues d'un grand intérêt car elles sont souvent actives à l'égard de plusieurs agents pathogènes d'origine alimentaire, à Gram positif telles que *L. monocytogenes* et *S. aureus* et à Gram à négatif telles qu'*E. coli* (**Vera Pingitore et al., 2012 ; Barbosa et al., 2014**).

4.2. Test des puits

Pour la recherche de l'activité inhibitrice dans le surnageant de culture des isolats lactiques, la méthode de diffusion en puits a été effectuée. Le test des puits en utilisant le surnageant brut de culture des isolats lactiques (pH, tableau 4, annexe II) a montré, que les isolats S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S12, S15, S18, S20 et S21 ont été doués d'une activité inhibitrice vis-à-vis des souches cibles (diamètres des zones d'inhibitions, tableau 5, annexe II). Les meilleures zones d'inhibition ont été enregistrées avec l'isolat S15 et l'isolat S18 avec un diamètre de 18 mm vis-à-vis de *S. aureus* (Fig. 4). L'isolat S20 a donné une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre.

Comme cité précédemment en 4.1., l'activité inhibitrice pourrait être attribuée aux métabolites produits par les isolats lactiques à savoir : les acides organiques, le CO₂, le H₂O₂ et des composés de natures protéiques telles que les bactériocines.

L'absence de toute activité antibactérienne par les isolats S9 et S11 révélés actifs avec le test des spots pourrait indiquer que l'effet inhibiteur observé par le contact direct dans le test des spots pourrait être attribué à un effet de compétition nutritionnelle entre cellules sans synthèse de métabolites inhibiteurs ou à leur faible production sous les conditions de culture utilisées (**Tagg et al., 1976 ; Mami et al., 2008**).

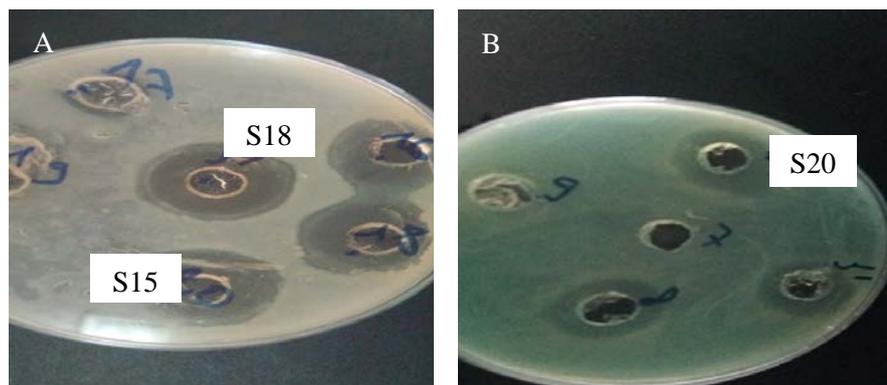


Fig.4. Activité antibactérienne des isolats S18 et S15 à l'égard de *S. aureus* (A) et de l'isolat S20 à l'égard de *P. aeruginosa* (B) révélée par le test des puits

▪ **Test des puits après neutralisation du surnageant**

Après avoir neutralisé le pH du surnageant à un pH de 6,8 aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée, l'effet inhibiteur des surnageants pourrait être attribué à la production d'acides organiques induisant l'abaissement du pH et créant un environnement défavorable au développement de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*.

D'après, Tienungoon *et al.* (2000), ces acides sont très inhibiteurs et le degré d'inhibition est en fonction de la concentration de l'acide non dissocié.

Selon Todorov *et al.* (2011), l'activité antagoniste contre les bactéries pathogènes est due à l'action du pH bas ou à une action synergétique entre les substances antibactériennes synthétisées par les souches de bactéries lactiques, et une variation de 0,5 dans le pH peut entraîner une importante diminution dans l'activité des bactériocines.

▪ **Test des puits après traitement enzymatique**

Après traitement avec de la pepsine préparée dans du tampon KCl-HCl (pH 2) et neutralisation du pH avant réalisation du test des puits, aucune zone d'inhibition n'a été constatée, ce qui assure que l'enzyme a détruit ces substances qui sont de nature protéique.

Achemchem et Abrini, (1997), ont montré que sur 100 isolats lactiques 31 sont sensibles au moins à l'une des trois enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine et pepsine).

Ait Ouali *et al.* (2014) confirme dans son étude que l'activité exercée sur les souches pathogènes par les surnageants de cultures de bactéries lactiques est due à une substance de nature protéique qui, en contact avec les protéases perd son activité.

5. Tolérance aux pH

Les résultats du test de résistance à l'acidité ont montré que la résistance varie selon les isolats. Après analyse des résultats obtenus, les observations suivantes ont été notées :

- A pH 3, aucun isolat n'a donné une croissance,
- A pH 4, 21/21 isolats ont donné une bonne croissance,
- A pH 5, 21/21 les isolats ont donné une bonne croissance.

Une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité gastrique ; ce dernier pouvant varier entre pH 1 après un jeûne et pH 4,5 à la suite d'un repas (**Maragkoudakis et al., 2006**).

À pH 4 et à pH 5 les isolats lactiques ont montré un maximum de viabilité (100%) et l'absence de toute croissance à pH 3 après incubation pendant 24 h peut être expliquée par l'incapacité à s'adapter (survivre) à l'acidité.

Une étude réalisée sur 7 souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* afin de tester leur résistance à pH 3, a montré que ces dernières ont une capacité de survie pendant uniquement 3 h (**Mishra et Prasad, 2005**).

5 souches de *Lb. bulgaricus* ont été soumises à une étude comparative de leur capacité à tolérer le stress acide. Les souches ont été transférées d'un milieu à pH 6 au pH 3,6 pendant 30 min. Après mesure du taux de survie, il a été remarqué que uniquement une souche qui tolérait le stress acide mieux que les autres. De quoi confirmer que la tolérance à l'acidité est une caractéristique de souche (**Guillouard et al., 2003**).

6. Tolérance aux sels biliaries

Après l'analyse des résultats (Fig. 5), les observations suivantes ont été notées :

- A 0,3 % de sels biliaries, 21/21 isolats ont montré une bonne croissance,
- A 1% de sels biliaries, 6/21 isolats ont montré une bonne croissance,
- A 3% de sels biliaries aucun isolat n'a montré une croissance.

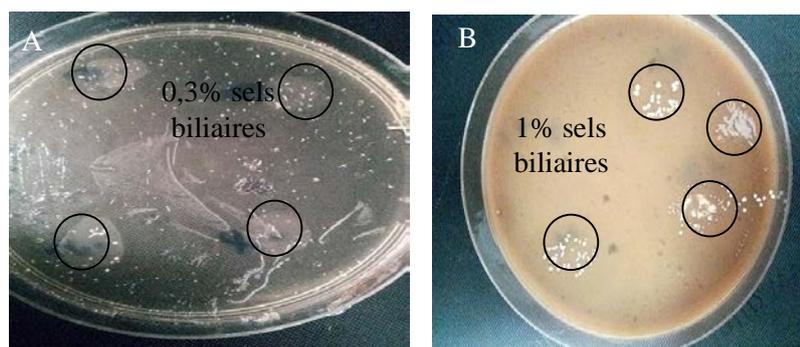


Fig.5. Isolats lactiques résistants aux sels biliaries : 0,3% (A) et 1% (B)

La concentration physiologique en bile chez l'Homme se situe entre 0,1 et 0,5 % (Denohue, 2004).

Song *et al.* (2015), ont montré une tolérance et une croissance de certaines souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus...*) sur MRS additionné de 0,3 % et de 1% de sels biliars. Ce résultat est en accord avec le notre, car tous les isolats lactiques ont montré une bonne croissance en présence de 0,3 % de sels biliars et 6 isolats (S1 S5 S6 S10 S11 et S12) ont donné une bonne croissance en présence de 1% de sels biliars.

Il a été rapporté, que certaines souches de bactéries lactiques comme exemple les lactobacilles sont capables de métaboliser leurs acides biliars ce qui les protèges contre la bile, l'un des mécanismes de cette résistance est la déconjugaison des acides biliars par les enzymes hydrolase des sels biliars, ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (Hamon *et al.*, 2011 ; Midassirou *et al.*, 2012).

7. Adhésion sur microplaque en polystyrène

Les valeurs d'absorbance à 570 nm (A_{570}) (tableau 6, annexe II) sont considérées comme un indice de l'adhésion bactérienne à la surface interne des microplaques et la capacité des bactéries à former des biofilms (Fig. 6).

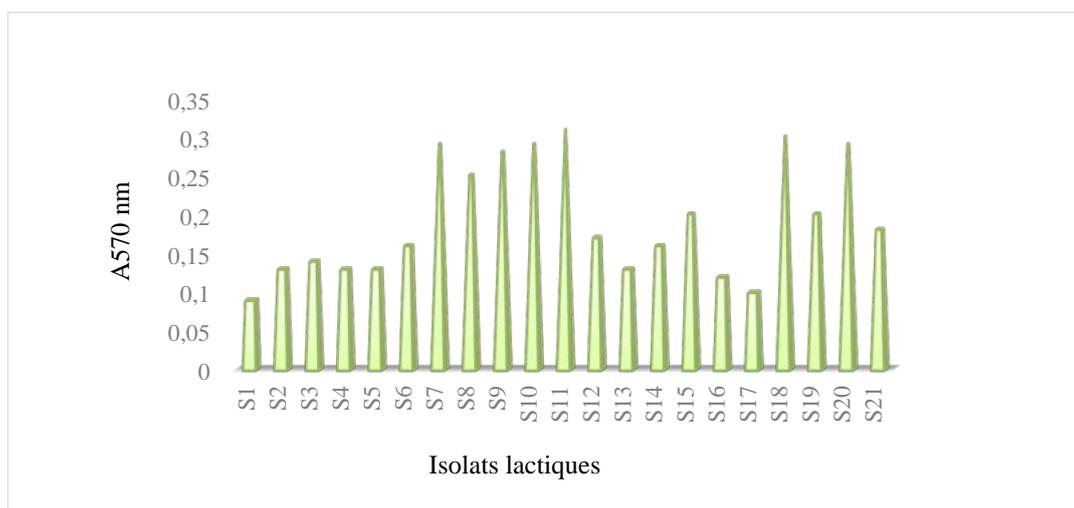


Fig.6. Valeurs d'absorbance à 570 nm enregistrées par des isolats lactiques

Les isolats sont classés dans quatre catégories: non-adhérents (pas de production de biofilms), faiblement adhérents (faible production de biofilms), moyennement adhérents (production moyenne ou modérée de biofilms) et fortement adhérents (production forte de

biofilms) suivant la méthode adoptée par Mathur *et al.* (2006) tel qu'indiqué sur la Fig.7 et dans le tableau ci-dessous.

Tableau III. Classification de l'adhésion bactérienne

Valeur de l'A570	Adhésion /formation de biofilms
$A \leq 0,07$ témoin négatif	Non
$0,14 \geq A > 0,07$	Faible
$0,28 \geq A > 0,14$	Modérée
$A > 0,28$	Forte

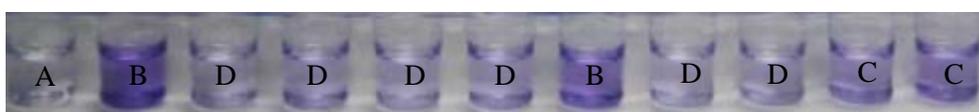


Fig.7. Adhésion bactérienne dans des microplaques de polystyrène de 96 puits après coloration au cristal violet, (A) : pas d'adhésion, (B) : forte adhésion, (C) : adhésion modérée et (D) : faible adhésion

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats lactiques ont adhéré dans la microplaque. Parmi les isolats ayant montré une forte adhésion et un fort biofilm formé, les isolats S7, S10, S11, S18 et S20 ($A > 0,28$). Les isolats S6, S8, S9, S12, S14, S15, S19, S21 ont présenté une adhésion modérée ($0,28 \geq A > 0,14$) contrairement aux isolats S1, S2, S3, S4, S5, S13, S16 et S17 qui ont présenté une faible adhésion.

Il a été rapporté que beaucoup d'effets bénéfiques des probiotiques semblent être liés directement à leur capacité d'adhésion et de former de biofilms, cette capacité permet aux probiotiques d'empêcher l'installation de bactéries pathogènes (Salas-Jara *et al.*, 2016), et de résister aux mouvements péristaltiques de l'intestin : si les probiotiques peuvent adhérer à la muqueuse intestinale, ils tiendront plus longtemps. Moduler le système immunitaire : les probiotiques adhérents sont en contact direct avec les cellules immunitaires de l'épithélium intestinal, ils pourront donc moduler ou stimuler le système immunitaire (Mack et Lebel, 2003 ; Forestier *et al.*, 2001).

8. Identification des isolats lactiques criblés

Le résultat des tests d'identification (type fermentaire, fermentation du lait écrémé stérile, croissance à différentes températures...) appliqués sur les 21 isolats lactiques est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV. Identification phénotypique des isolats lactiques (Axelsson, 2004 ; Pilet et al., 2005).

Test	Catalase	GRAM	Forme	Types de fermentation	Thermo-résistance	Acidification du lait écrémé	Croissances à:		Croissance à pH :			Croissance dans le NaCl			VP	AD H	Genre probable
							37C°	44C°	9,5	5,5	2%	4%	6%				
Souches																	
S1	-	+	Bacille	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S2	-	+	Bacille	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S3	-	+	Bacille	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S4	-	+	Bacille	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S5	-	+	Cocci	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Enterococcus</i>
S6	-	+	Bacille	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Lactobacillus</i>
S7	-	+	Bacille	Homo	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Lactobacillus</i>
S8	-	+	Cocci	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S9	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S10	-	+	Cocci	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Lactococcus</i>
S11	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Enterococcus</i>
S12	-	+	Bacille	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S13	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S14	-	+	Bacille	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>
S15	-	+	Cocci	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
S16	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S17	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S18	-	+	Cocci	Homo	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
S19	-	+	Cocci	Homo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
S20	-	+	Cocci	Homo	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Streptococcus</i>
S21	-	+	Bacille	Homo	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Lactobacillus</i>

(+) Résultat positif ; (-) Résultat négatif

La présence de divers genres de bactéries lactiques dans le lait cru de chèvre était prévisible.

L'étude des caractères biochimiques et physiologiques des 21 isolats lactiques ont permis de mettre en évidence différents genres.

Les coques lactiques homofermentaires mésophiles qui se développent dans une gamme de températures allant de 10 à 45 °C, avec une température optimale de 35 °C, qui peuvent survivre à 65 °C pendant 30 min, qui poussent dans des conditions hostiles de 6 % de NaCl et dans une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6 sont considérés probablement comme appartenant au genre *Enterococcus* (Aguilar *et al.*, 2012), cela a été appliqué aux souches S5, S8, S9, S11, S13, S16, S17 et S19.

Selon Karam, (2006), les souches homofermentaires qui ne poussent pas à 6% de NaCl et à 44°C peuvent être appartenant au genre *Lactococcus*, cela a été attribué aux souches S10, S15 et S18.

Les cocci en chaînette capables de croître à pH 5,5, thermorésistants et ne produisant pas d'acétoïne tel que la souche S20 peut appartenir au genre *Streptococcus* (Badis *et al.*, 2005).

Les souches S1, S2, S3, S4, S6, S7, S12, S14 et S21 ont été des bacilles homofermentaires, mésophiles résistantes aux pH acide/basique et productrices ou non d'acétoïne peuvent être appartenir au genre *Lactobacillus* (Badis *et al.*, 2005).

Une étude similaire a démontré la présence de différentes espèces de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Lactococcus* dans des produits laitiers (Lairini *et al.*, 2014).

Il a été rapporté par Badis *et al.* (2005), dans l'identification de bactéries lactiques du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (arabia, et kabyle) que les lactocoques et les entérocoques ainsi que les lactobacilles sont les plus présents de l'ensemble des bactéries lactiques isolées.

9. Critères de sécurité des souches d'*Enterococcus*

9.1. Test de résistance à la vancomycine

Les facteurs importants contribuant à la pathogénicité et à la virulence des entérocoques sont leur résistance à une large variété d'antibiotiques notamment à la vancomycine (Teuberet *et al.*, 1999) et aussi à la production de certaines substances telles les hémolysine. Néanmoins, ce ne sont pas tous les entérocoques qui sont considérés comme néfastes pour l'Homme, certaines souches peuvent être bénéfiques à la santé humaine, comme par exemple, *En. faecium* SF68 qui a été utilisée pour traiter des diarrhées associées aux antibiotiques (Psoni *et al.*, 2006).

Selon le « CLSI » (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011), les souches du genre *Enterococcus* sont sensibles si le diamètre critique ≥ 17 mm. Les résultats de notre étude ont montré que toutes les souches d'entérocoques sont sensibles à la vancomycine avec un diamètre ≥ 18 mm (Fig. 8). Les zones d'inhibition enregistrées sont présentées dans le tableau 7 annexe 2. Le même résultat a été retrouvé par Elisha et Courvalin, (1995) ; Ammor *et al.* (2007).



Fig.8. Exemple de la sensibilité à la vancomycine par des souches d'*Enterococcus*

9.2. Test d'hémolyse

Il est bien connu que l'hémolyse est associée à la pathogénicité des entérocoques en raison de la production d'hémolysines, par conséquent l'absence de l'activité hémolytique devrait être démontrée. Le test d'hémolyse réalisé sur les souches identifiées comme étant des entérocoques n'a montré aucune zone d'hémolyse (γ -hémolyse) autour des colonies sur la gélose au sang de mouton (Fig. 9).



Fig.9. Absence d'hémolyse chez les souches d'*Enterococcus*

Plusieurs souches d'entérocoques ont été démontrées non hémolytiques, **Pienizet *al.* (2014)** ont rapporté l'absence d'hémolyse chez la souche *En. durans* LAB 18s isolée de fromage Frescal (fromage brésilien à pâte molle). Le même résultat a été obtenu pour une souche d'*En. faecium* isolée d'un fromage frais égyptien au lait cru (**Barbosa *et al.*, 2014**) et pour une souche

d'*En. lactis* IITRHR isolée d'un fromage traditionnel (**Sapna et al., 2012**). En effet l'absence de tout signe d'hémolyse indique l'aspect sécuritaire de nos souches.

L'objectif de notre travail était d'étudier les propriétés probiotiques de quelques souches de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre. Pendant notre pratique, 21 isolats de bactéries lactiques ont été isolés et étudiés. Les isolats lactiques ont subi six principaux tests : test des spots, test des puits, test de résistance aux pH, test de résistance aux sels biliaries, test d'adhésion et test d'identification. Les résultats obtenus sont les suivants :

- 9 souches appartenant au genre *Lactobacillus*,
- 8 souches appartenant au genre *Enterococcus*,
- 3 souches appartenant au genre *Lactococcus*,
- 1 souche appartenant au genre *Streptococcus*.

Les souches du genre *Lactococcus* (S15 et S18) et *Streptococcus* (S20) ont été les plus inhibitrices à l'égard des bactéries pathogènes comme il a été confirmé par le test des spots et le test des puits.

Toutes les souches lactiques ont résisté à l'acidité (pH 4 et pH 5), ainsi qu'à une concentration de 0,3 % de sels biliaries, quelques souches du genre *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* ont même résisté à une concentration de 1% de sels biliaries.

Toutes les souches lactiques ont la capacité d'adhérer et de former des biofilms comme il a été démontré par le test d'adhésion.

Le travail qui a été réalisé n'est que préliminaire, mais il est intéressant, ainsi, les travaux suivants peuvent lui être complémentaires :

- Confirmation de l'identité des souches par des méthodes moléculaires,
- Etude des critères de sécurité des souches, à savoir, le test de cytotoxicité,
- Etude des effets probiotiques *in vivo* des souches,
- Mise au point d'un lait fermenté probiotique à base des souches étudiées.

- **Achemchem F, Abrini J .1997.** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology* **70**: 660-669.
- **Aguilar Galvez A, Dubois Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P .2012.** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **16**: 67-76.
- **Ait Meddour A, Bendali F, Sadoun D .2014.** Anti-adherence potential of *Enterococcus durans* cells and its cell-free supernatant on plastic and stainless steel against foodborne pathogens. *Folia Microbiologica Journal* **60**: 357-363.
- **Ait Ouali F, Alkassaa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib N-D, Drides D .2014.** Identification of *Lactobacilli* with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stain less steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology* **191**: 116-124.
- **Ammor MS, Florez AB, Mayo B .2007.** Antibiotic resistance in non *enterococcal* lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Food Microbiol Journal* **24**: 559-570.
- **Axelsson L .2004.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker* **139**: 135-142.
- **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". *Sciences & Technologie C Biotechnologies* **23**: 30-37.
- **Barbosa J, Borges S, Teixeira P .2014.** Selection of potential probiotic *En. faecium* isolated from portuguese fermented food. *International Journal of Food Microbiology* **191**: 144-148.
- **Barfoot S F, Kleanhammer T R .1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lb. acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 1808-1815.
- **CA-SFM .2009.** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2009. Paris, France: Société Française de Microbiologie.
- **De Vuyst L, Vandamme E J .1994.** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional (Glasgow)* 130-140.
- **Denohue DC .2004.** Safety of novel probiotic bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker* 531-546.
- **Dib H, Hajj Semaan E, Mrad R, Ayoub J, Choueiry L, Moussa H, Bitar G .2012.** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal* **13**: 43-58.

- **Djaafaru T F, Rahayu E S, Wibowo D, Sudarmadji S .1996.** Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus sp.* TGR-2 isolated from growol. *Indonesian. Food and Nutrition Progress* **3**: 29-34.
- **Djadouni F, Kihal M .2012.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **55**: 435-444.
- **Dortu C, Thonart P .2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **13**: 143-154.
- **Dridier D, Fimland G, Héchard Y, Mc Mullen L M, Prevost H .2006.** The continuing story of class II abacteriocin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **702**: 564-582.
- **Elisha B G, Courvalin P .1995.** Analysis of genes encoding D-alanine, D-alanine ligase related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus spp.* *Gene* **152**: 79–83.
- **Fernàndez M, Martínez-Bueno M, Martín M C, Valdivia E, Maqueda M .2007.** Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 1350-1361.
- **Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B .2001.** Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* **152**: 167-173.
- **Forssten S D, Lahtinen S J, Ouwehand A C .2011.** The intestinal microbiota and probiotics In Malago, JJ, Konikx, JFJG, Marinsek-Loger, R., Probiotic Bacteria and Enteric Infections- Cryoprotection by Probiotic Bacteria 41-63.
- **Fuller R. 1989.** Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* **66**: 365-378.
- **Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A .2016.** Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology* **50**:116-119.
- **Gern J E .2015.** Promising candidates for allergy prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **136**: 23-28.
- **Ghraiiri T, Frere J, Berjeaud J M, Manai M .2008.** Purification and characterisation of bacteriocins produced by *En. Faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control* **19**: 162–169.

- **GuRX, Yang ZQ, Li ZH, Chen SL, Luo ZL .2008.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stoolsamples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama,Guangxi. China. *Anaerobe* **14**: 313-317.
- **Guillouard I, Lim E M, Van de Guchte M, Grimaldi C, Penaud S, Maguin E .2004.** Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Le Lait* **84**:1-6.
- **Giraud J P .1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod/RIA*. Paris, P. 696.
- **Guiraud J P .2003.** Microbiologie Alimentaire, *Dunod*.Paris, P.652.
- **Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude Werner D, Ennahar S .2011.** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol* **11**:191-201.
- **Kamiya T, Watanabe Y, Makino S, Kano H, Tsuji N .2016.** Improvement of intestinal immune cell function by lactic acid bacteria for dairy products. *Microorganisms* **5**: 1.
- **Karam H Z, Karam N E .2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel **24**: 153-156.
- **Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri E M .2013.** Health benefits of probiotics. *A review ISRN nutrition*.
- **König H, Fröhlich J .2017.** Lactic acid bacteria in biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.*Heidelberg Springer* 3-41.
- **Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M, Ouhssine M .2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux* **144**: 237.
- **Lairini S, Beqqali N, Bouslamti R, Belkhou R, Zerrouq F .2014.** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Internationale des Sciences et Technologie* **10**: 267-277.
- **Leuschner R G, Robinson T. P, Hugas M, Cocconcelli P S, Richard-Forget F, Klein G, Suarez J E .2010.** Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* **21**: 425-435.
- **Lilly D M, Stillwell R H .1965.** Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**: 747-748.
- **Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y .2014.** Biodiversity of lactic acid bacteria. In Lactic acid bacteria. *Springer Dordrecht* 103-203.

- **Mack DR, Lebel S .2003.** Rôle of probiotics in the modulation of intestinal infections and inflammation. *Current Opinion in Gastroenterology* **20**: 22-26.
- **Mami A, Henni J E, Kihal M .2008.** Antibacterial activity of *Lactobacillus* isolated from Algerian raw goat's milk against *S. aureus*. *World Journal of Dairy and Food Science* **3**: 39-49.
- **Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E .2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* **16**: 189-199.
- **Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D J, Fatma T, Rattan A .2006.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**: 25-9.
- **Midassirou B, Mahdhi A, Chaieb K, Bakhrouf A .2012.** Recherche de bactéries lactiques et étude *in vitro* de leurs propriétés probiotiques. *Microbiologie industrielle, sanitaire, et environnementale* **147-163**.
- **Mishra V, Prasad D N .2005.** Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **103**: 109-115.
- **Mokoena M P .2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens. *A mini-review Molecules* **22**: 1255.
- **Motyl I, Klewicka E, Libudzisz, Z .2009.** New strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei*. *Polish Patent Application* 147-160
- **Mugula J K., Nnko S A M, Narvhus J A, Sørhaug T .2003.** Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International journal of food microbiology* **80**: 187-199.
- **Muñoz R, Moreno-Arribas M V, de las Rivas B .2011.** Lactic acid bacteria. *In Molecular Wine Microbiology* 191-226.
- **Novel G .1993.** Les bactéries lactiques. *In* Leveau JY et Bouix M (ed.), *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. 170-3310.
- **OMS .2001.** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*.
- **Ouwehand A C, Salminen S .2003.** *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance. *A review Microbial ecology in health and disease* **15**: 175-184.

- **Parker R B .1974.** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutritional Health* **29**: 4-8.
- **Pieniz S, Martin de Moura T, Vaz Cassenego A P, Andrezza R, GuedesFrazzon A P, Facio de Oliveira Camargo F, Brandelli A .2014.** Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *En. Durans* with potential probiotic effect. *Food Control* **51**: 49-54.
- **Pilet M F, Magras C, FederighiM .2005.** Bactéries lactiques in Bactériologie alimentaire : compendium d'hygiène des aliments. *Economica* 219-239.
- **Psoni L, Kotzamanides C, Andrighetto C, Lombardi A, Tzanetakis A, Litopoulou-Tzanetaki E .2006.** Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 109-120.
- **Rastall R A, Gibson G R, Gill H S, Guarner F, Klaenhammer T R, Pot B, Sanders M E .2005.** Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS microbiology ecology* **52**: 145-152.
- **Reiner K .2010.** Catalase test protocol. *American Society for Microbiology*. ASM Microbe Library.
- **Reis S A, Conceição L, Rosa D D, Siqueira N P, Peluzio M C G .2017.** Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. *Nutrition research reviews* **30**: 36-49.
- **Rivas F P, Castro M P, Vallejo M, Marguet E, Campos CA .2012.** Antibacterial potential of *En. faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT Food Science and Technology* **46**:428-435.
- **Salas-Jara M, Ilabaca A, Vega M, García A .2016.** Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms* **4**(3): 35.
- **Sapna S, Jaya M P, Chaturvedi M, Bhushan P, Chaudhari M V, Ram L, Singh, Poonam K .2012.** Probiotic *En. lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Nutrition* **28**: 173–181.
- **Schillinger U, Lucke F K .1989.** Antibacterial activity of *Lb. sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1901-1906.
- **Schleifer K H, Ehrmann M, Beimfohr C, Brockmann E, Ludwig W, Amann R .1995.** Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **5**: 1081-1094.

- **Settanni L, Corsetti A .2008.** Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 123-138.
- **Shi L H, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Ismail N I M, Yin O S .2016.** Beneficial properties of probiotics. *Tropical life sciences research* **27**(2): 73.
- **Song M, Yun B, Moon JH, Park DJ, Lim K, Oh S .2015.** Characterisation of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. *korean journal of food science animal resource* **35**: 551-556.
- **Stiles M E, Holzapfel W H .1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology* **36**: 1-29.
- **Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W .1976.** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Reviews* **40**: 722-756.
- **Tambekar D H, Bhutada S A .2010.** An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus sp* from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research in Science and Technology* **2**(10).
- **Teuber M, Meile L, Schwarz F .1999.** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 115–137.
- **Tienungoon S. Ratkowsky D A, Mcmeekin T A, Ross T .2000.** Growth limits of *L. monocytogenes* function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4979-4987.
- **Todorov SD, Dicks LMT .2005.** **Characterization** of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology* **45**: 312-322.
- **Vera Pingitore E, Todorov S D, Sesma F, Franco, B D G M .2012.** Application of Bacteriocino genic *En. mundtii* CRL35 and *En. faecium* ST88Ch in the control of *L. monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology* **32**: 38–47.
- **Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J .2004.** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International journal of food microbiology* **96** :149-164.
- **Villena J, Kitazawa H .2017.** Probiotic microorganisms. *A closer look*.7-10
- **Villena J, Racedo S, Agüero G, Alvarez S .2006.** Yoghurt accelerates the recovery of defence mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* in protein-malnourished mice. *British journal of nutrition***95**: 591-602.
- **Widyastuti Y, Rohmatussoliha T, Febrisiantosa A .2014.** The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences* **5**: 435-442.

- **Yamada N, Saito Iwamoto C, Nakamura M, Soeda M, Chiba Y, Kano H, Asami Y .2017.** *Lactobacillus gasseri*PA-3 uses the purines IMP, inosine and hypoxanthine and reduces their absorption in rats. *Microorganisms* **5**(3): 10.

Composition des milieux de culture (Selon les fournisseurs)

Tableau.1. Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniacale	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	Qsp 1L

pH 6,5

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar

Tableau.2. Gélose M17

Composant	g/l
Peptone de soja	5
Peptone de viande	2.5
Tryptone	2.5
Extrait de levure	5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Acide ascorbique	0.5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0.25
Agar	20
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7,2

Tableau.3. Bouillon nutritif (BN)

Composant	g/l
Peptone	10
NaCl	5
Extrait de levures	5
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7,2

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar

Tableau.4. Milieu Moeller à l'arginine

Composant	g/l
Arginine ou lysine ou ornithine	0.2
Extrait de levure	1
Glucose	1
Pourpre de bromocrésol	5
NaCl	2

pH 6,8

Tableau.5. Milieu Clark et Lubs

Composant	g/l
Peptone	5
Glucose	5
Hydrogénophosphate de potassium	5

pH 7,5

Tableau.6. Bouillon Muller-Hinton

Composant	g/l
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Fécule	1,5
Extrait de bœuf	3
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar

Tableau.1. Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005).

	Milieux de culture	Type d'ensemencement	T°	Incubation (h)
Streptocoques lactiques	M17	en surface	45/37	72
Lactocoques	M17	surface	37	72
Leuconostocs	MRS	en masse/en surface	30	7
Pediocoques	M17	en masse/en surface	37	72
Lactobacilles mésophiles	MRS	En masse/en surface	37	24
Lactobacilles thermophiles	MRS	En masse/en surface	45	24

Tableau.2. Standardisation des isolats de bactéries lactiques

Isolates lactiques	UFC/ml
S1	4.10 ⁸
S2	4.10 ⁸
S3	4.10 ⁸
S4	4.10 ⁸
S5	5.10 ⁸
S6	3.10 ⁸
S7	5.10 ⁸
S8	4.10 ⁸
S9	4.10 ⁸
S10	3.10 ⁸
S11	5.10 ⁸
S12	4.10 ⁸
S13	4.10 ⁸
S14	6.10 ⁸
S15	4.10 ⁸
S16	5.10 ⁸
S17	3.10 ⁸
S18	3.10 ⁸
S19	5.10 ⁸
S20	4.10 ⁸
S21	6.10 ⁸

Tableau.3. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par test de spot

A l'égard de <i>S. aureus</i>		A l'égard de <i>P. aeruginosa</i>	
Isolats lactiques	Diamètre (mm)	Isolats lactiques	Diamètre (mm)
S1	10	S1	12
S2	12	S2	14
S3	6	S3	10
S4	8	S4	12
S5	11	S5	8
S6	8	S6	4
S7	4	S7	6
S8	4	S8	8
S9	2	S9	2
S10	12	S10	12
S11	6	S11	14
S12	18	S12	8
S13	2	S13	2
S14	2	S14	16
S15	20	S15	16
S16	15	S16	2
S17	3	S17	2
S18	10	S18	14
S19	12	S19	1
S20	21	S20	21
S21	12	S21	18

Tableau.4. pH du surnageant de culture brut des isolats lactiques

Isolats lactiques	pH
S1	3,82
S2	4,06
S3	4,02
S4	4,03
S5	4
S6	4,01
S7	4,20
S8	3,89
S9	4,50
S10	4,46
S11	4,65
S12	3,95
S13	4,12
S14	4,07
S15	4
S16	4,25
S17	4,40
S18	3,98
S19	5,8
S20	4
S21	4,10

Tableau.5. Diamètre des zones d'inhibition enregistrés par test de puits

A l'égard de <i>S. aureus</i>		A l'égard de <i>P. aeruginosa</i>	
Isolats lactiques	Diamètre (mm)	Isolats lactiques	Diamètre (mm)
S1	8	S1	6
S2	10	S2	4
S3	12	S3	7
S4	14	S4	4
S5	10	S5	4
S6	6	S6	10
S7	12	S7	0
S8	16	S8	10
S9	0	S9	0
S10	12	S10	1
S11	0	S11	0
S12	4	S12	10
S13	1	S13	2
S14	1	S14	2
S15	18	S15	11
S16	15	S16	1
S17	3	S17	1
S18	18	S18	4
S19	3	S19	1
S20	17	S20	16
S21	3	S21	8

Tableau.6. Valeurs d'absorbance mesurées après adhésion des isolats lactiques

Isolats lactiques	A570 nm
S1	0,09
S2	0,13
S3	0,14
S4	0,13
S5	0,13
S6	0,16
S7	0,29
S8	0,25
S9	0,28
S10	0,29
S11	0,31
S12	0,17
S13	0,13
S14	0,16
S15	0,20
S16	0,12
S17	0,10
S18	0,30
S19	0,20
S20	0,29
S21	0,18

Tableau.7. Diamètre des zones d'inhibition enregistrés par test antibiogramme

Souches lactiques	Diamètre (mm)
S5	18
S8	18
S9	24
S11	20
S13	19
S16	18
S17	24
S19	21

Coloration de Gram

- Recouvrement du frottis fixé à la chaleur par le violet de Gentiane pendant 1 min,
- Lavage à l'eau distillée,
- Ajout de lugol pendant 1min,
- Lavage à l'eau distillée,
- Décoloration à l'éthanol environ 20s,
- Lavage à l'eau distillée,
- Coloration avec de la fuschine pendant 1min,
- Lavage à l'eau distillée,
- Séchage de la lame,
- Observation à Gx100 avec ajout d'une goutte d'huile à immersion.

Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$.

La technique consiste à déposer une goutte de H_2O_2 sur une lame qui contient une colonie prélevée à partir de la gélose MRS isolée d'une culture de 24 h. La lecture du résultat est immédiate : s'il y a effervescence, signe d'un dégagement gazeux d'oxygène, la souche testée est dite catalase positive, sinon elle est considérée comme étant catalase négative (**Reiner, 2010**).

Présenté par : M^{elle} Azizi H
M^{elle} Bouchicha A

Présidente : Mme Amira S
Examineur : Mr Rahmoune Y
Encadreur : Dr Ait meddour A

Isolement et sélection de souches de bactéries lactiques à effet probiotique

Résumé

Objectif : étude des propriétés probiotiques de souches de bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre.
Matériel et méthodes : six principaux tests ont été réalisés sur les isolats lactiques : test des spots, test des puits, test de résistance aux pH, test de résistance aux sels biliaires, test d'adhésion et test d'identification.
Résultats obtenus : les souches appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, et toutes les souches sont douées d'un potentiel probiotique.
Conclusion : les souches de bactéries lactiques étudiées peuvent être utilisées comme probiotique.
Mots clés : probiotique, bactérie lactique, lait cru de chèvre.

Abstract

Objective: to study the probiotic properties of strains of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk.
Material and methods: six main tests were carried out on the lactic isolates: spot test, well test, pH resistance test, bile salt resistance test, adhesion test and identification test.
Results obtained: the strains that showed a probiotic potential belong to the genus: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*.
Conclusion: the lactic acid bacteria strains studied can be used as probiotics.
Key words: probiotic, lactic acid bacteria, goat's milk.

الملخص

الهدف: دراسة الخصائص النفعية لبعض سلالات بكتيريا اللبن المعزولة من حليب الماعز الطازج.
المواد و الطرق المنتهجة: تم إجراء 6 اختبارات على البكتيريا المعزولة: اختبار البقعة, اختبار البئر, اختبار مقاومة أملاح الغدة الصفراوية, اختبار مقاومة الحموضة, اختبار الالتصاق, كما أجريت اختبارات لتحديد هوية السلالات المعزولة.
النتائج: تنتمي السلالات التي أظهرت خصائص نافعة إلى الأنواع التالية:
Lactobacillus, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Eterococcus*
الخاتمة: يمكن استخدام سلالات بكتيريا اللبن المعزولة من حليب الماعز لتمتعها بخصائص البكتيريا النافعة.
الكلمات المفتاحية: البكتيريا النافعة, بكتيريا اللبن, حليب الماعز.