RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**
En Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologique
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Par

KECHAD Salsabil

KHELIFATI Nahla

Thème

Isolement et sélection des souches de bactéries Lactiques productrices des métabolites Antimicrobiennes

Soutenue publiquement le 24/06/2024 Devant le jury composé de

TOUMI Selma	**MCB** U Médéa	Présidente
TOUZOUT Nabil	**MCB** U Médéa	Examinateur
BOUCHIBANE Malika	**MCB** U Médéa	Encadreur
HAMED Djahira	**MAB** U Ain Temouchent	Co-Encadreur

Année universitaire 2024/2025

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, qu'il nous soit permis de témoigner à toutes les personnes qui nous ont Aidé à faire aboutir ce modeste travail nos plus vifs remerciements

Nous remercions tout d'abord ALLAH de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour arriver á ce niveau d'étude et réaliser ce modeste travail.

Nous parents qui ont donné tout au long de notre formation, tout ce que nous avons besoin et Particulièrement leurs amours et tendresses, ainsi que nos frères, sœurs et amis. Nous Tenons à remercier tout particulièrement :

Nous remercions notre encadreur Dr. BOUCHIBANE Malika, Maître conférence B à l'université Dr. Yahia Fares de Médéa, pour l'aide et son encouragement d'avoir ennobli de diriger ce travail

Nous remercions notre Co-encadreur Dr. HAMED Djahira, Maître assistante B à l'université Ain temouchent

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury :

TOUMI Selma (Maître conférence B à l'université de Médéa), La Présidente du jury.

TOUZOUT Nabil (Maître De Conférence B à l'université de Médéa), Examinateur.

A madame tifoura Amina pour son aide dans laboratoire microbiologique

À tous nos collègues de Microbiologie
À tous les étudiants de Master Microbiologie de la promotion 2020 / 2025.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également de toute Personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je rends grâce à Dieu qui m'a permis de suivre ce chemin. Sans Sa volonté, je ne serais pas ici aujourd'hui.

J’ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail à :

Mes chers parents

À mon père **Mr. Khelifati Noureddine** qui m’a encouragée tout au long de mon parcours et s’est sacrifié pour moi, que Dieu te garde à mes côtés comme un soutien inébranlable.

À ma mère **Oulia ABDOU** qui a sacrifié sa vie pour moi, toute ta fatigue se reflète dans mon diplôme.
Heureusement que tu es ma mère.

À mon cher mari **Mr. Semrani** À mon soutien qui a eu le mérite de m'amener jusqu'à ce point, Heureusement que tu es dans ma vie.

À mon frère **Mohamed**, qui s’est dévoué pour ma scolarité depuis mon enfance, ce diplôme est le fruit de tes efforts. Mille mercis à toi.

À mon frère **Abdelhadi** et à mes sœurs **Nadia** et **Salsabil**, merci pour votre présence et votre soutien.

À mon âme **Sana**, qui m’a soutenue depuis le début de mon parcours universitaire. Tu as été une véritable amie pour moi. Merci pour tout ce que tu m’as offert.

À mes çiçikler **Sarah, marwa, ibtihal, hadil, hadjer, Hayat, Ratiba, hala, Ahlem** et **Asma** vous avez été un véritable pilier dans ma vie. Je vous remercie d’avoir été à mes côtés dans chaque détail de mon existence. Votre présence est une bénédiction de Dieu pour moi.

À mon binôme **salsabil** qui a partagé la fatigue de cette mémoire, merci pour les jours que nous avons passés ensemble.

À tous les diplômés de Gaza qui ont quitté cette vie avant d’obtenir leur diplôme,

À ses enfants innocents tués injustement, Je vous adresse toutes mes excuses, du plus profond du cœur.

À travers ses lignes je ne peux pas vous décrire tous mes sentiments d’amour, le seul mot que je peux dire est merci, vraiment merci beaucoup à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire.

Khelifati nahla

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

À mes chers parents, pour leur dévouement, leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

À ma mère Dalila, présence constante dans ma vie, source infinie de patience, de tendresse et de générosité, flamme de mon cœur qui m'a appris que la patience est le secret de la réussite.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, **mon père Kamel**, à ma sœur unique **Sidra**, pour son soutien inestimable.

À mes deux petits frères chéris, **Idris** et mon petit poussin **Rassim**, à toute ma grande famille, qui m'ont soutenue durant toute la durée de la réalisation de ce travail. En particulier **mon grand-père**, dont les prières m'ont accompagnée avec bienveillance.

À tous ceux dont l'amour sincère et le soutien fidèle m'ont accompagnée tout au long de ce parcours.

À mes chères amies, **Ikram**, qui n'ont cessé de m'encourager.

Et enfin, à mon binôme **Nahla**, pour le travail remarquable que nous avons accompli ensemble.

Je remercie également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ce travail.

Salsabil Kechad

SOMMAIRE .

TABLE DES MATIERES

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les bactéries lactiques.....2

I.1. Généralités sur les bactéries lactiques..... 2

.1.1. Historique..... 2

I.1.2. Définition 2

I.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques..... 3

I.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques 4

I.3.1. Lactobacilli..... 5

I.3.2. Lactococcus..... 7

I.3.3. Enterococcus..... 8

I.4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques..... 9

I.4.1. Méthode phénotypique..... 9

I.4.2. Méthode génotypique..... 10

I.4.2.1. Méthodes d'amplification PCR 10

I.4.2.2. L'amplification polymorphe aléatoire de l'ADN (RAPD, pour Random Amplified Polymorphic DNA)..... 10

I.5. Les métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques 11

1.5.1. Peroxyde d'hydrogène..... 12

1.5.2. Le dioxyde de carbone 12

1.5.3. Le diacétyl 13

1.5.4. Les acides organiques..... 13

1.5.5. Les Bactériocines 14

I.6. Bactéries lactiques et fermentation alimentaire..... 18

SOMMAIRE .

1.7. Bactéries lactiques et santé humaine 18
II. Les abeilles 19
II.1. Généralités et caractéristiques des abeilles 19
II.1.1. Anatomie et physiologie de l'abeille 20
II.1.2. Caste d'abeille 22
II.2. Effets bénéfiques sur la santé et la conservation des aliments 23

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Lieu et objectif 26
2. Matériel 26
2.1. Matériels biologiques 26
2.2. Les souches de références 26
2.3. Matériel non biologique 26
3. Méthodes 27
3.1. Revivification et Vérification de la pureté des souches pathogènes de référence 27
3.2. Conservation des souches pathogènes 27
3.3. Isolement et identification des bactéries lactiques 27
3.3.1. Échantillonnage 27
3.3.2. Préparation de l'échantillon 28
3.3.3. Identification phénotypique 29
3.3.3.1. Examen macroscopique 29
3.3.3.2. Examen microscopique 29
3.3.4. Identification biochimiques et physiologiques 29
4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne 32
4.1. Méthode des disques 33
4.2. Méthode des puits 34
4.3. Test d'activité Antimicrobienne par méthode des 《 Cylindre D'agar » 34
5. Détermination du métabolite inhibiteur des bactéries lactiques 34
6. Mesure de la cinétique 36
6.1. Cinétique de croissance bactérienne par mesure de la densité optique (DO) 36
6.2. Dénombrement des cellules viables (UFC) 36
7. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 36

CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSSION

SOMMAIRE .

III.1. Revivification et confirmation de la pureté des souches pathogènes 38
III.1.1. Examen macroscopique 38
III.1.2. Examen macroscopique 40
III.2. Isolement et identification des bactéries lactiques 41
III.2.1. Examen macroscopique 42
III.2.2. Examen microscopique 42
III.2.4. Résultats des tests physiologiques et biochimiques 45
III.2.5. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques 48
III.2.6. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne 49
III.2.7. Résultats de la Cinétique de croissance des souches 53
III.2.8. Metabolite antimicrobienne 57
III.2.9. Concentration minimale inhibitrice CMI 58
Conclusion
Références bibliographiques
Annexes

Résumé

Face à l'augmentation préoccupante des résistances antimicrobiennes et à la nécessité de développer des alternatives naturelles et durables, cette étude s'inscrit dans une démarche innovante visant à explorer une niche écologique peu étudiée : le microbiote intestinal d'abeilles locales (*Apis mellifera*) en tant que source potentielle de bactéries lactiques (LAB) à propriétés antimicrobiennes. Six souches lactiques ont été isolées à partir d'abeilles collectées dans diverses régions d'Algérie. Leur caractérisation morphologique, biochimique et physiologique a permis de suggérer leur appartenance aux genres *Lactobacilli* et *Lactococcus*. L'évaluation de l'activité antimicrobienne, réalisée à l'aide de différentes méthodes de diffusion (puits et disques), a révélé un pouvoir inhibiteur significatif chez quatre souches codées AB, D, E et C4, avec des zones d'inhibition comprises entre 22 et 26 mm. Ces souches se sont montrées actives contre des pathogènes de référence, notamment *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella spp.*, *Candida albicans* ATCC10231 et *Aspergillus brasiliensi* ATCC16404. L'analyse des surnageants de culture a mis en évidence un mécanisme d'action dominant : l'acidification du milieu par la production d'acides organiques inhibant la croissance microbienne. Les résultats ont été renforcés par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI. En outre, les souches ont démontré une bonne résistance aux variations de température, de pH, de salinité, ainsi qu'une tolérance modérée à certains antibiotiques, renforçant leur intérêt pour des applications industrielles diversifiées. Cette étude souligne l'intérêt de valoriser le microbiote des abeilles comme réservoir naturel de bactéries lactiques bioactives, offrant des perspectives concrètes dans le développement de bioconservateurs, de probiotiques naturels, et d'alternatives antimicrobiennes durables.

Mots-clés :

Bactéries lactiques, microbiote des abeilles, *Apis mellifera*, activité antimicrobienne, acides organiques.

Abstract

In response to the alarming rise in antimicrobial resistance and the urgent need to develop natural and sustainable alternatives; this study adopts an innovative approach by exploring an under-investigated ecological niche: the intestinal microbiota of local honeybees (*Apis mellifera*) as a potential source of lactic acid bacteria (LAB) with antimicrobial properties. Six LAB strains were isolated from honeybees collected across various regions of Algeria. Their morphological, biochemical, and physiological characterization suggested their affiliation with the genera *Lactobacillus* and *Lactococcus*. The antimicrobial activity, assessed using various diffusion methods (well and disc diffusion), revealed significant inhibitory potential in four coded strains (AB, D, E, and C4), with inhibition zones ranging from 22 to 26 mm. These strains exhibited activity against several reference pathogens, including *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella spp.*, *Candida albicans* ATCC10231, and *Aspergillus brasiliensi* ATCC16404. Analysis of culture supernatants revealed a dominant mechanism of action: acidification of the medium due to the production of organic acids, which inhibited microbial growth. These findings were further supported by the determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs), confirming the efficacy of the extracts even at very low concentrations. Additionally, the strains demonstrated good resistance to environmental stress factors such as temperature, pH, and salinity, as well as moderate tolerance to certain antibiotics, underscoring their potential for diverse industrial applications. This study highlights the value of exploiting honeybee microbiota as a natural reservoir of bioactive LAB, offering promising perspectives for the development of natural biopreservatives, probiotic agents, and sustainable antimicrobial alternatives.

Keywords:

Lactic acid bacteria, honeybee microbiota, *Apis mellifera*, antimicrobial activity, organic acids.

الملخص

نظرًا للارتفاع المقلق في مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية والحاجة الملحّة لتطوير بدائل طبيعية ومستدامة، تندرج هذه الدراسة ضمن مقاربة مبتكرة تهدف إلى استكشاف مجال بيئي غير مدروس بشكل كافٍ: وهو الميكروبيوتا المعوي لنحل العسل المحلي ((Apis mellifera كمصدر محتمل للبكتيريا اللبنية (LAB) ذات الخصائص المضادة للميكروبات.

تم عزل ست سلالات لبنية انطلاقًا من نحل تم جمعه من مناطق مختلفة من الجزائر. وقد سمح التوصيف المورفولوجي، والبيوكيميائي، والفسيولوجي بتحديد انتمائها إلى جنسي Lactococcus. و Lactobacillus.

أُجري تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طرق نشر متعددة (الآبار والأقراص)، وكشف عن قدرة تثبيطية قوية لدى أربع سلالات مشفّرة بـ AB، D، E، وC4، حيث تراوحت مناطق التثبيط بين 22 و26 ملم. وقد أظهرت هذه السلالات نشاطًا واضحًا ضد عدد من الممرضات المرجعية، خاصة: Escherichia coli ATCC25922، Staphylococcus aureus ATCC25923، Salmonella spp.، Candida albicans ATCC10231 وAspergillus brasiliensis ATCC16404.

أبرز تحليل الراشح الخلوي آلية تأثير رئيسية تتمثل في: تحمّض الوسط نتيجة إنتاج الأحماض العضوية التي تعيق نمو الميكروبات. وقد تم تدعيم هذه النتائج من خلال تحديد التركيز المثبط الأدنى (CMI).

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت السلالات المعزولة مقاومة جيدة لتغيرات الحرارة، والأس الهيدروجيني، والملوحة، مع تحمّل متوسط لبعض المضادات الحيوية، مما يعزز من قيمتها في تطبيقات صناعية متنوعة.

تسلط هذه الدراسة الضوء على أهمية تثمين ميكروبيوتا نحل العسل كمصدر طبيعي للبكتيريا اللبنية، مما يفتح آفاقًا واعدة في تطوير المواد الحافظة الحيوية، والمكملات البروبيوتيكية الطبيعية، وبدائل مضادة للميكروبات مستدامة.

الكلمات المفتاحية

النشاط المضاد للميكروبات، الأحماض العضوية. ،Apis mellifera البكتيريا اللبنية، ميكروبيوتا النحل.

Liste des tableaux

Tableau 01 : principaux genres des bactéries lactiques 5

Tableau 02 : Caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées 10

Tableau 03 : Souches de références utilisées..... 25

Tableau04 : interprétation des résultats..... 33

Tableau 05 : Observation macroscopique des bactéries pathogènes 38

Tableau 06 : Observation microscopique des bactéries pathogènes 40

Tableau 07 : Observation microscopique des bactéries Lactiques 42

Tableau 08 : Caractérisation des tests physiologiques et biochimiques des isolats ... 46

Tableau 09 : Résultats du profil fermenter des sucres (microplaques et API20E)..... 46

Tableau 10 : Résultats de tests de sensibilité aux antibiotiques 47

Tableau11 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des souches lactiques testées vis-à-vis les souches pathogènes(mm) par méthode plugs d'agar 48

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des souches lactiques testées vis-à-vis les souches pathogènes(mm) par méthode des disques 51

Tableau 13 : résultats de métabolite antimicrobienne 52

Tableau 14 : Résultat de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par protocole 1 58

Tableau 15 : Résultat de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par protocole 2 59

Liste des figures

Figure 01 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques 4

Figure 02 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative du gène ARN16S. Montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage G+C dans l'ADN et les bactéries Gram + du genre Bifidobacterium, Propionobacterium 5

Figure 03 : Lactobacillus casei au microscope électronique 6

Figure 04 : Lactococcus lactis au microscope électronique 7

Figure 05 : Arbre phylogénétique par la méthode du Neighbour-joining montrant les relations entre les isolats des trois patients et les espèces d'Enterococcus apparentées 8

Figure 06 : Enterococcus faecalis au microscope électronique 9

Figure 07 : Différentes approches moléculaires appliquées à l'écologie microbiennes des aliments 11

Figure 08 : Représentation schématique de l'acide lactique 13

Figure 09 : Représentation schématique de l'acide acétique 14

Figure 10 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisine) et B (mersacidin) 15

Figure 11 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques 17

Figure 12 : Tête et yeux simple d'une abeille ouvrière 20

Figure 13 : Des pattes de l'abeille 21

Figure 14 : morphologie de l'abeille 21

Figure 15 : la méthode d'extraction et isolement des bactéries à partir des abeilles . 27

Figure 16 : Aspect macroscopique des isolats sur BN avant et après 38

Figure17 : Aspect macroscopique des souches sur les milieux solides 39

Figure18 : Observation macroscopique des bactéries lactiques 41

Figure 19 : Aspect macroscopique des isolats sur les différents bouillons 39

Figure 20 : Aspect macroscopique des isolats sur les différents bouillons 42

Figure 21 : Résultat de test oxydase 44

Figure 22 : Galerie API 20E des isolats 47

Figure 23 : L'antibiogramme des quelques souches testées 49

Figure 24 : Résultat d'activité antimicrobienne aux différents souches 50

Figure 25 : des courbes de la CMI (Concentration minimale inhibitrice) des bactéries lactiques (AB, D, E, C4) 54

Figure 26 : un courbe comparatif de la CMI (Concentration minimale inhibitrice) des bactéries lactiques (AB, D, E, C4) 54

LISTE DES FIGURES .

Figure 27 : un courbe comparatif de la CMI (par UFC) des bactéries lactiques (AB, D, E, C4) **56**

Figure 28 : Dénombrement des bactéries lactiques **56**

Figure 28 : Résultat de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pa9 protocole 1 ..... **60**

Figure 30 : Résultat de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par protocole 2 ..... **52**

Liste des abréviations

BL : Bactéries Lactiques

ADN : Acide Désoxyribonucléique

MRS : Milieu de Man Rogosa Sharpe

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

API: Analytical Profile Index

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARn 16S: Acide ribonucléique ribosomal 16S

CO: Dioxyde de carbone

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

FCM: Flow Cytometry

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization

G+C: Guanine + Cytosine

MH: Mueller-Hinton

NaCl : Chlorure de sodium

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RISA / A-RISA: Ribosomal Intergenic Spacer Analysis / Automated RISA

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

TSA-FISH : Tyramide Signal Amplification FISH

T°C : Température en degrés Celsius

Liste des abréviations .

UFC : Unité Formant Colonie

PH : Potentiel Hydrogène

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des millénaires, les micro-organismes sont utilisés dans la transformation et la conservation des aliments, souvent de manière empirique, sans que leurs mécanismes d'action soient pleinement compris. Parmi eux, les bactéries lactiques (LAB – *Lactic Acid Bacteria*) occupent une place centrale en raison de leur capacité à produire une large gamme de composés antimicrobiens naturels, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines, ainsi que divers métabolites secondaires aux propriétés conservatrices et thérapeutiques (Gálvez et al., 2007 ; Parvez et al., 2006).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes Gram positifs, catalase-négatifs, non sporulants et fermentaires. On les retrouve dans de nombreux milieux naturels et alimentaires, notamment dans le tractus digestif d'animaux et d'insectes. Elles jouent un double rôle : technologique, en participant à la fermentation de divers produits alimentaires, et sanitaire, en tant que probiotiques ou agents antimicrobiens (Sanders et al., 2019 ; Ouwehand et al., 2002).

Dans un contexte mondial marqué par la montée inquiétante des résistances bactériennes aux antibiotiques, l'intérêt pour des alternatives naturelles s'est intensifié. Les LAB apparaissent ainsi comme des candidates prometteuses, capables d'inhiber un large éventail de bactéries pathogènes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Pseudomonas* spp. (Dobson et al., 2012 ; Yang et al., 2012).

Par ailleurs, les insectes, et en particulier l'abeille domestique (*Apis mellifera*), constituent une niche écologique encore peu explorée pour l'isolement de souches bactériennes bénéfiques. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de LAB spécifiques dans le microbiote intestinal des abeilles, jouant un rôle important dans la protection contre les pathogènes de la ruche et dans le maintien de leur santé globale (Vásquez et al., 2012). Ce potentiel microbiologique, encore peu valorisé dans notre pays, mérite une attention particulière.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail, qui adopte une approche à la fois exploratoire et appliquée. L'objectif est d'isoler et de sélectionner des souches de bactéries lactiques à partir d'abeilles adultes prélevées dans différentes régions d'Algérie, afin d'évaluer leur activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches pathogènes de référence. Ce travail pourrait ainsi contribuer à l'identification de nouvelles souches d'intérêt biotechnologique, avec des applications potentielles dans la bio préservation des aliments ou dans le domaine de la santé animale et humaine.

CHAPITRE I :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Bactéries lactiques

I.1.Généralités sur les bactéries lactiques

1.1. 1.Historique

Les bactéries lactiques existent depuis près de 3 milliards d'années dans la nature.

L'évolution des bactéries lactiques a été facilitée par l'apparition des grands mammifères producteurs de lait, il y a environ 65 millions d'années. Cette évolution s'est accélérée lorsque l'humanité est passée du mode de vie de chasseurs-cueilleurs à celui d'éleveurs, environ 8 000 ans avant notre ère.

Les premiers récipients perforés, découverts sur les rives du lac de Neuchâtel, datent de 3 000 ans avant notre ère. Durant cette période, en Égypte, en Sumer et en Macédoine, les humains maîtrisaient déjà le processus de coagulation du lait.

Ces bactéries sont extrêmement bénéfiques pour l'homme. Elles jouent un rôle crucial dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme le fromage, le pain, le vin, et la choucroute dans les régions tempérées. Elles sont également essentielles dans la production de divers produits alimentaires à base de céréales, de tubercules, de poisson et de viande dans les régions tropicales. (Tailliez Patrick et al ; 2001)

I.1.2. Définition

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes anaérobies hétérotrophes qui peuvent tolèrent l'oxygène (Tailliez Patrick et all ;2001)

Ces micro-organismes sont caractérisés comme Gram-positives, aérobies facultatifs, des bacilles et Cocci sporogènes qui sont négatifs pour l'oxydase, la catalase et la benzidine. Elles sont dénuées de cytochromes, ne réduisent pas les nitrates en nitrites, négatives pour la gélatinase et incapables d'exploiter le lactate. (Carr et al ;2002)

Et constituent un ensemble varié de microorganismes qui génèrent de l'acide lactique comme produit majeur de leur métabolisme. (Stiles et al ; 1997)

Les bactéries lactiques se servent principalement de la glycolyse pour leur approvisionnement énergétique et régénèrent principalement leurs cofacteurs à NADH en transformant le pyruvate en lactate. (Tailliez et all ; 2001)

Elles sont surtout employées comme culture de départ dans les aliments fermentés par la fermentation lactique qui décrite comme un processus de fermentation impliquant un ensemble de bactéries gram-positives, non-sporulantes, fixes, catalase-négatives, qui se développent dans des conditions anaérobies et exploitent les sources de carbone pour

générer l'acide lactique en tant qu'acide organique principal ou unique. (YAO.A et all ; 2009)

On compte treize genres distincts de bactéries lactiques :

Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus (hugenholtz J et all ; 1999)

Grâce à leur métabolisme, elles contribuent à prolonger la durée de conservation originale des produits et leur apportent une saveur et une texture distinctes. Ces micro-organismes s'implantent dans une variété d'aliments tels que les produits laitiers, la viande, les légumes et les céréales, et ils constituent une composante de la flore intestinale et vaginale chez l'homme ou l'animal. Elles participent à une multitude de fermentations spontanées de produits alimentaires.

(Badis et all 2005, Stiles et all 1997)

I.2.Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Orla-Jensen (1919) a défini le groupe des bactéries lactiques, qui regroupe plusieurs genres identifiés par leur aptitude à fermenter les glucides pour générer de l'acide lactique (NovelG.,1993)

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu C et Thonart P., 2009), Les LAB ou bactéries lactiques, sont des organismes Gram positifs qui ne forment pas de spores, qui sont négatifs pour la catalase, qui ne possèdent pas de cytochromes et qui ont des habitudes non aérobies mais aérotolérantes. Ils sont exigeants, tolérants aux acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras et strictement fermentatifs (Holzapfel et al.,2001).

Les bactéries lactiques sont regroupées en homofermenteurs ou hétérofermenteurs en fonction du produit final de leur fermentation :

- Les homofermenteurs produisent de l'acide lactique comme principal produit de la fermentation du glucose
- Les hétérofermenteurs produisent un certain nombre de produits en plus de l'acide lactique, notamment du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol à partir de la fermentation du glucose. (Teuber, M 1993).

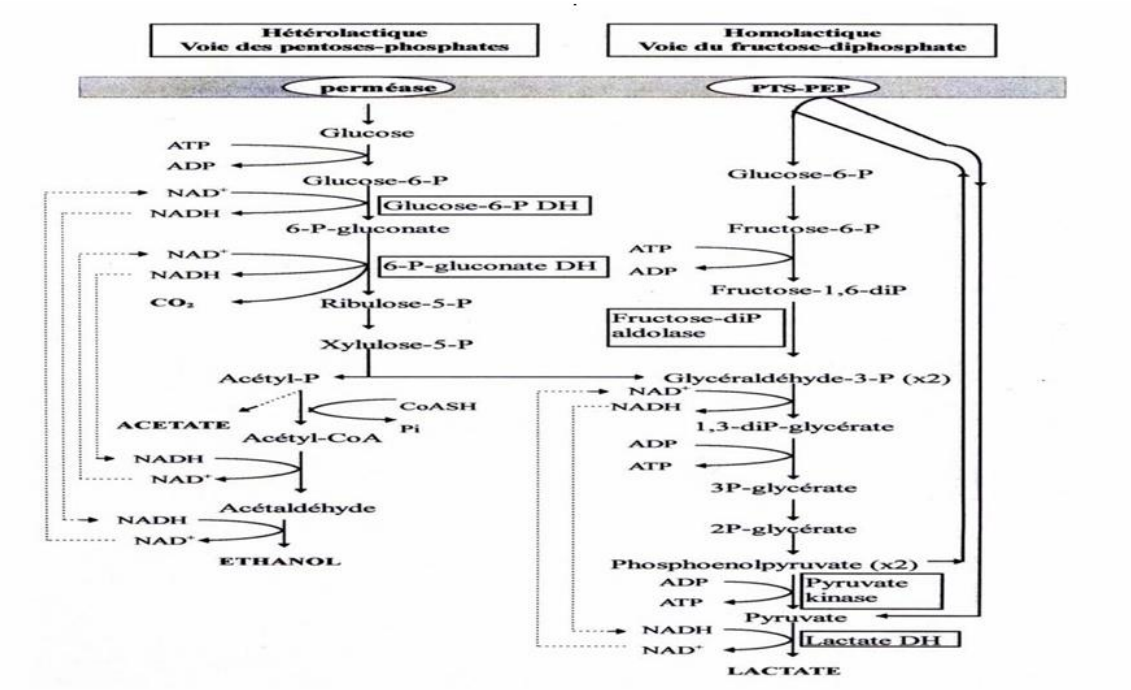


Figure 01 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et De Roissart, 1994)

I.3.Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

Il existe treize genres distincts de bactéries lactiques :

Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus (hugenholtz J et all ; 1999)

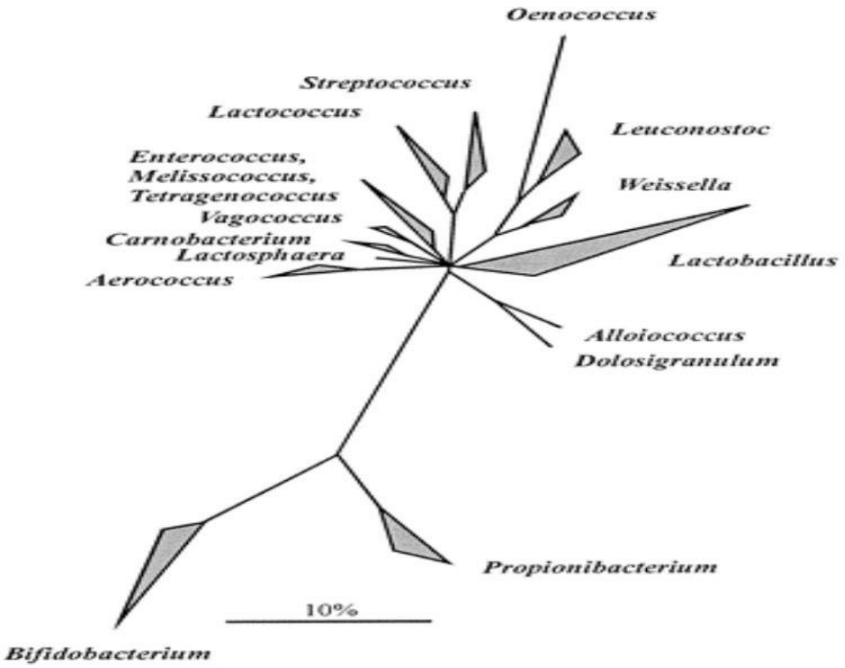


Figure 02 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative du gène ARN16S. Montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage G+C dans l'ADN et les bactéries Gram + du genre Bifidobacterium, Propionobacterium (Holzapfel et al ,2001)

Tableau 01 : principaux genres des bactéries lactiques (MAMOROS S., 2008)

Genre	Forme de cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
Lactobacillus	Bacilles	Homo ou hétéro fermentaire	D (-), L (+)	Lb. Delbrueckii
Lactococcus	Coques	Homofermentaire	L (+)	Lc. Lactis
	Coques	Homofermentaire	L (+)	Ec. Faecalis

I.3.1. Lactobacilli :

Taxonomiquement la famille Lactobacillaceae abrite actuellement en octobre 2012 valablement identifiées 152 espèces du genre Lactobacillus. L'analyse phylogénétique actualisée fondée sur la séquence du gène 16S rRNA a démontré que la famille se segmente en 15 catégories comportant trois espèces ou plus, comprenant 4 paires et 10 lignées individuelles. (Elisa Salvetti ,2012). Les Lactobacilles sont des bactéries qui ne forment pas de spores, Gram-positives, se présentent sous la forme de bâtonnets ou de coccobacilles, et possèdent généralement un

contenu en G+C de l'ADN qui est inférieur à 50 mol%. Ces dernières sont exclusivement fermentatives, aérotolérantes ou anaérobies, aciduriques ou acidophiles et présentent des besoins nutritionnels complexes. Elles peuvent démontrer des activités liées à la catalase, à la réduction des nitrites ou même aux cytochromes. (Bruno Pot,2014). Les bactéries lactiques jouent un rôle crucial en microbiologie des aliments et en nutrition humaine. De nombreuses variétés de Lactobacillus sont importants dans la fabrication d'aliments fermentés et servent de cultures initiales ou de conservateurs alimentaires. (Walter P 1995)

Les lactobacilles ont été classés selon leur température de croissance et leur capacité à fermenter les hexoses, puis selon leur potentiel homo ou hétérofermentatif basé sur la nature des sucres fermentés et des produits de fermentation. (Elisa Salvetti ,2012)

- Les lactobacilles homofermentatif : (dénommés groupe métabolique A)
  Transforment presque exclusivement > 85%
  les hexoses en acide lactique, tandis que les pentoses et les gluconates
  ne subissent pas de fermentation. (Frank et Carr ,2002. Elisa Salvetti ,2012)
- Les espèces hétérofermentatives facultatives (groupe métabolique B) transforment les hexoses en acide lactique grâce à la voie d'Emden-Meyerhof-Parnas EMP et ont la capacité de décomposer les pentoses et le gluconate par l'intermédiaire d'une phosphocétolase inductible. (Frank et Carr ,2002. Elisa Salvetti ,2012)
- Les lactobacilles obligatoires hétérofermentatif (catégorie métabolique C) ont une aldolase FDB, mais ne possèdent pas de phosphocétolase. Ils métabolisent les pentoses et hexoses uniquement par la voie du phosphogluconate. Elisa (Salvetti ,2012)



Figure 03 : Lactobacillus casei au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008)

I.2.3. Lactococcus

Les lactocoques sont des bactéries Gram-positives de forme coccoïde, anaérobies et non mobiles, qui se présentent sous forme de diplocoques ou de chaînes de Cocci. Elles génèrent spontanément de l'acide lactique L (+) à partir du lactose contenu dans le lait cru laissé à une température ambiante d'environ 20-30 °C pendant une durée de 10 à 20 heures. (A. Mofredj H,2007) (M Teuber,1995)

Lactococcus est crucial dans le secteur de la fermentation, étant utilisé pour la fabrication d'une variété de produits fermentés, ainsi que pour la fermentation de produits laitiers et ses applications en biotechnologie (Adeline, 2017 ; Jomaa, 2007).

Le genre Lactococcus comprend 5 espèces. Lactococcusgarvieae, Lactococcuspiscium, Lactococcusraffinolactis, Lactococcusplantarum et

Lactococcuslactis lui-même divisé en 3 sous espèces :

Cremoris, hordniae et lactis. (JomaaAlomar, 2007)

Selon Badis cette bactérie prospère dans un milieu de culture Eliker et nécessite une incubation aérobique de trois jours à une température de 30°C. (Badis et al,2005)

Lactococcus produire des composés plus spécialisés, inhibiteurs de bactéries ou bactéricides, comme la nisine de L. lactis et la diplococcine de L. lactiscremoris. Pour des objectifs thérapeutiques, ces enzymes ont été envisagées, car elles permettent d'inhiber la prolifération d'autres souches bactériennes dans le substrat. (A. Mofredj H ,2007)

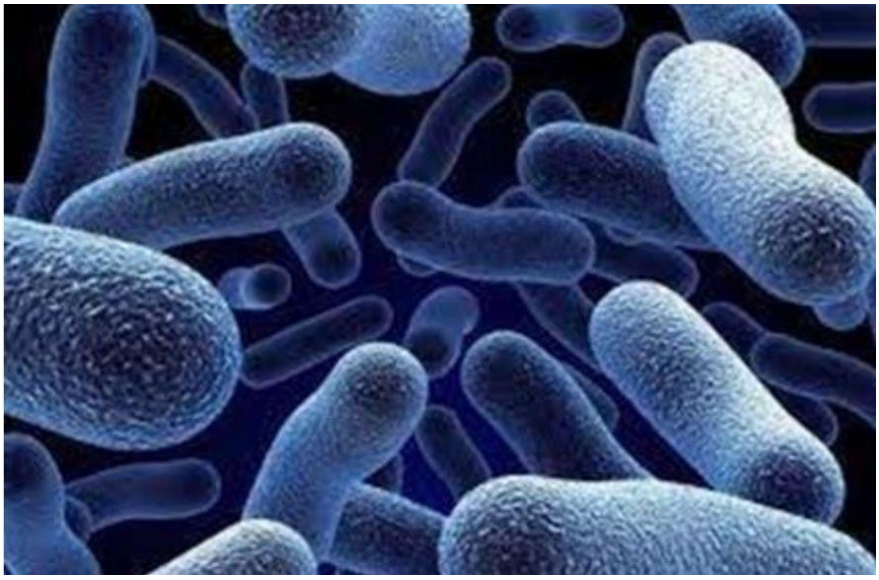


Figure 04 : Lactococcuslactis au microscope électronique (Corrieu et luquet, 2008)

I.3.3. Enterococcus

Les entérocoques sont des bactéries non sporulantes Gram-positives qui se présentent en paires, en chaînes où en groupes. Ce sont des anaérobies facultatifs chimio-organotrophes dotés d'un métabolisme homofermentatif, l'acide lactique étant le principal produit final de la fermentation des glucides. Avec un contenu génomique en bases GC assez faible, d'environ 34 à 45%, les entérocoques étaient catégorisés au sein du genre Streptococcus et classifiés comme streptocoques du groupe D jusqu'à la moitié des années 1980. (Mònica et al., 2019. Katie et al., 2009)

Ils peuvent résister à divers stress et conditions adverses, y compris des températures extrême s (5-65 °C), des niveaux de pH (4.5-10.0) et des concentrations élevées de NaCl. Les espèces appartenant au genre Enterococcus se distinguent par leur forte résistance aux éléments de l'environnement. On les trouve principalement dans l'intestin des êtres humains et des animaux, ainsi que dans l'environnement. Les espèces Enterococcus faecalis et Enterococcus faecium, auparavant connues sous le nom de streptocoques fécaux, sont toutes deux exploitées en tant que probiotiques. (Katie et al., 2009)

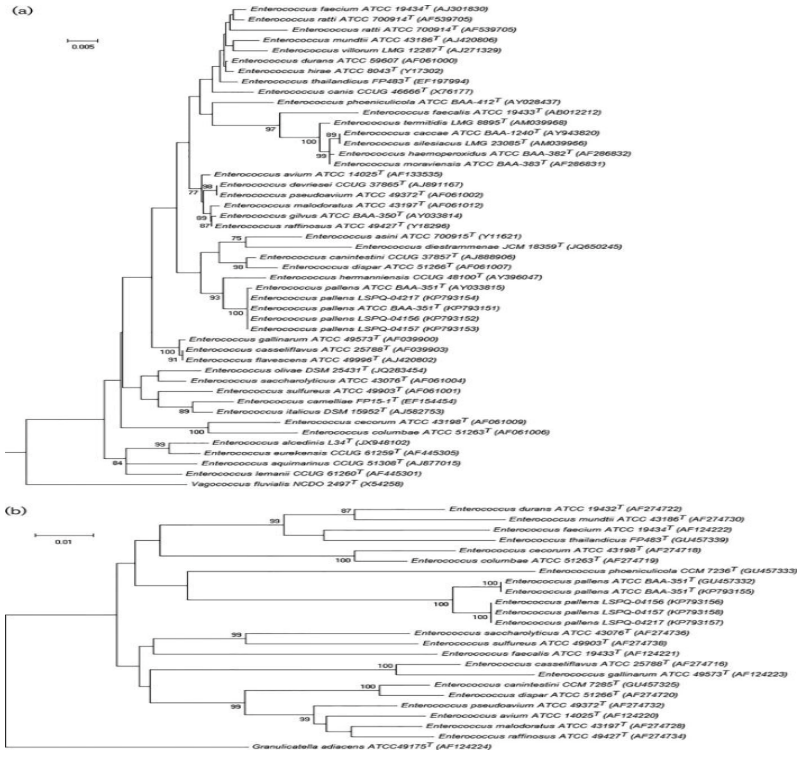


Figure 05 : Arbre phylogénétique par la méthode du Neighbour-joining montrant les relations entre les isolats des trois patients et les espèces d'Enterococcus apparentées. (Simon Lévesque et all, 2016)



Figure 06 : Enterococcus faecalis au microscope électronique (Wallace et al, 2003)

I.4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

I.4.1. Méthode phénotypique

Traditionnellement, la classification des bactéries lactiques s'est effectuée en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques, grâce à une analyse morphologique et physiologique. La première méthode consiste à examiner tous les isolats par coloration de Gram et observation microscopique pour distinguer les bactéries Gram-positives des Gram-négatives, identifier les bâtonnets et les coques ainsi que leur mode de regroupement, tout en confirmant l'absence de formation de spores. En ce qui concerne l'étude physiologique, elle implique de soumettre les individus suivants : Recherche sur la catalase, l'aptitude à croître à diverses températures et pH, différentes concentrations en NaCl, l'identification du type de fermentation par démonstration de production gaz (CO) ainsi que de production d'acides à partir des hydrates du carbone. (Dheeraj ,2004. Ennadir, 2014

Tableau 02 : Caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées. (Badis et al,2005)

Groupes des bactéries	Lactobacilles type 1	Lactobacilles type 2	Lactocoques	Leuconostoc
Forme macroscopique	Petites colonies blanches rondes ou lenticulaires	Petites colonies blanches à centre marron et bombées	Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Colonies transparents rondes et très petites
Forme microscopique	Petits bâtonnets en chaînettes	Bâtonnets longs enroulés Filamenteux, isolés ou en chaînettes	Cocci, diplocoques et en chaînette	Cocci, ovales, en chaînette
Température optimale	30C	45C	30C	30C

Type fermentaire	Homo fermentaire +hétéro fermentaire	Homo fermentaire	Homo fermentaire	Hétéro fermentaire

I.4.2. Méthode génotypique

Lors de l'étude des communautés microbiennes, les gènes fréquemment ciblés sont ceux de l'opéron ribosomal, en particulier l'ARNr 16S pour les bactéries (Abekhti ;2015). Plusieurs méthodes de génotypage peuvent être utilisées pour distinguer les espèces ou différencier les souches de LAB jusqu'au niveau clonal, en se basant sur leur capacité discriminatoire et leur applicabilité universelle. Il est désormais possible de différencier de façon fiable des souches étroitement apparentées présentant des caractéristiques phénotypiques semblables en utilisant des techniques basées sur l'ADN, comme le polymorphisme d'ADN amplifié aléatoirement (RAPD), le RFLP, le DGGE, le TGGE, ainsi que l'analyse de restriction de l'ADNr amplifié (ARDRA), grâce à l'amplification PCR ou à l'hybridation ex situ ou in situ avec des sondes d'ADN, d'ARN et même des acides nucléiques. (Dheeradj ;2004)

I.4.3. Méthodes d'amplification PCR

Ces techniques facilitent la classification des communautés microbiennes par séparation physique des acides nucléiques sur un gel d'électrophorèse, en fonction de la taille, des séquences et de la configuration des séquences. Cela donne un « profil » ou une « empreinte génétique » de la communauté microbienne. Ces procédés se basent essentiellement sur deux phases majeures : l'extraction des acides nucléiques et la multiplication par réaction en chaîne de la polymérase. (Abekhti ;2015)

1.4.2.2. L'amplification polymorphe aléatoire de l'ADN (RAPD, pour Random Amplified Polymorphic DNA)

L'approche repose sur l'utilisation d'un ou plusieurs amorces brèves (-10 pb) qui se lient à divers emplacements du génome, facilitant ainsi l'amplification de segments d'ADN. L'électrophorèse sur gel de fragments d'ADN amplifiés produit une empreinte unique. Cette méthode, grâce à sa simplicité, est considérée comme la technique fondamentale pour l'observation des variations de population. Bien que sa faible reproductibilité limite son application aux échantillons complexes, elle demeure pertinente pour le typage des souches microbiennes pures.

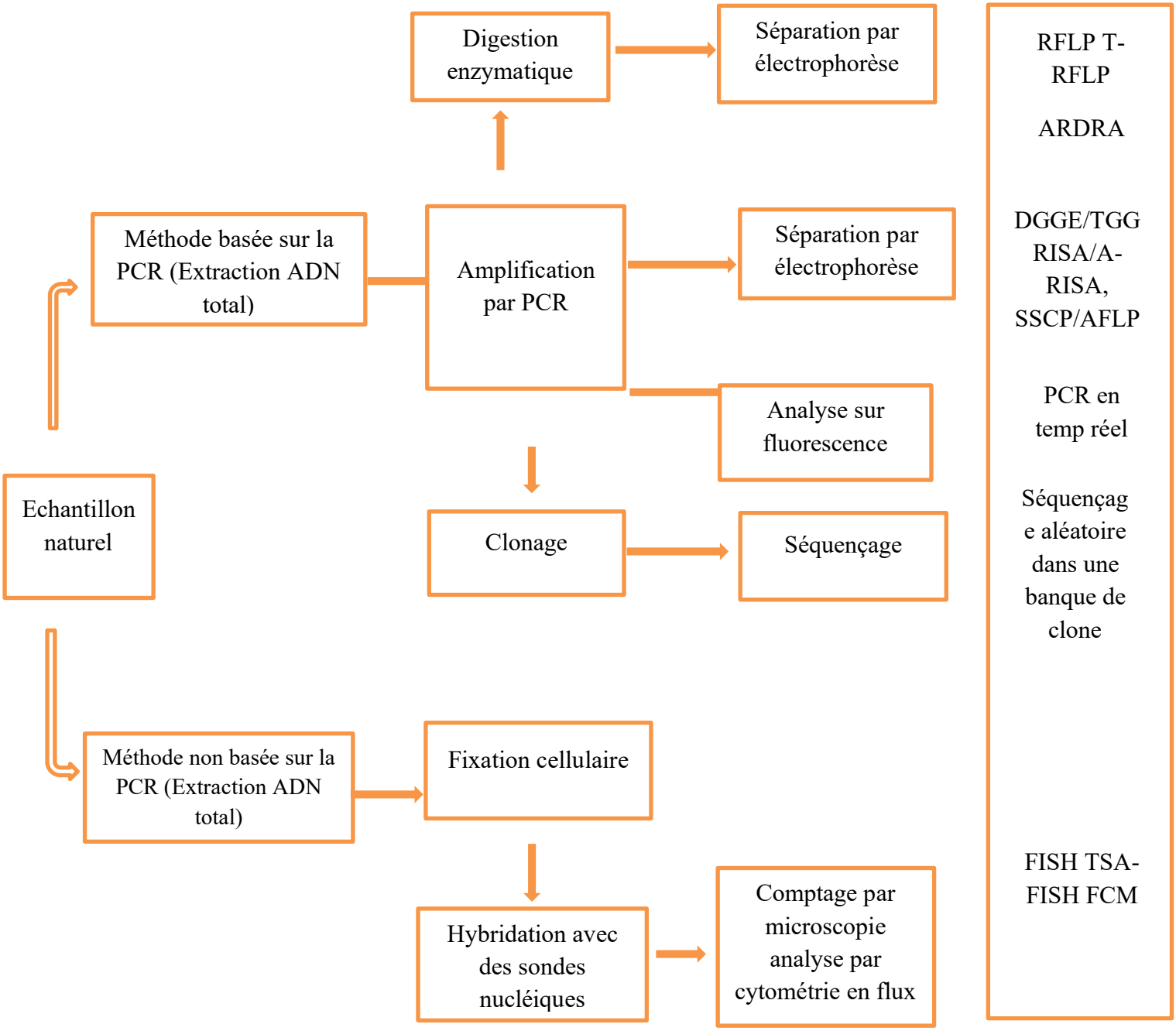


Figure 07 : Différentes approches moléculaires appliquées à l'écologie microbiennes des aliments (Abekhti, 2015)

I.5. Métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont reconnues pour leur capacité à produire une large gamme de composés antimicrobiens, comprenant des métabolites primaires et secondaires aux propriétés antagonistes. Leur mécanisme d'action repose essentiellement sur la synthèse d'acides

organiques, de peroxyde d'hydrogène, de dioxyde de carbone, de diacétyle et de bactériocines. L'effet inhibiteur résultant est généralement attribué à une interaction synergique entre ces différents composants, conférant ainsi aux bactéries lactiques un rôle clé dans la bio préservation et la sécurité microbiologique des aliments. (Kazatelová, 2003)

1.5.1. Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Van de Guchte et al, 2001). L'implication du peroxyde d'hydrogène dans le phénomène d'inhibition exercé par les bactéries lactiques a été démontrée. En 1952, il a été mis en évidence que Lactobacillus lactis inhibe Staphylococcus aureus, initialement attribué à une « lactobacilline ». Cependant, des recherches ultérieures ont confirmé que cet effet est en réalité dû au peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille. (Wheater et al., 1952)

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases responsables de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Par conséquent, l'accumulation de H_2O_2 dans leur environnement crée des conditions susceptibles d'inhiber la prolifération de divers microorganismes. (Condon, 1987). Cette molécule neutre traverse aisément la membrane cellulaire et présente une faible réactivité envers les constituants intracellulaires. En revanche, ses produits dérivés sont hautement toxiques pour la cellule, interagissant avec des biomolécules essentielles telles que l'ADN, les protéines et les lipides, ce qui conduit inexorablement à sa destruction. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène exerce un effet inhibiteur sur la croissance des micro-organismes dépourvus de mécanismes de défense efficaces, notamment les catalases. (Touati ,2000)

1.5.2. Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est principalement généré par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Toutefois, il joue un rôle crucial dans l'établissement d'un environnement anaérobie, limitant ainsi les réactions de décarboxylation enzymatique. De plus, son accumulation au sein de la bicouche lipidique membranaire peut altérer la perméabilité cellulaire, compromettant ainsi l'intégrité des membranes biologiques. Par ailleurs, le CO_2 exerce une action inhibitrice efficace sur la prolifération de nombreux micro-organismes impliqués dans la détérioration des denrées alimentaires, contribuant ainsi à leur conservation. (Amor et al., 2006)

1.5.3. Diacétyl

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est l'un des composants aromatiques essentiels du beurre, produit par de nombreuses bactéries lactiques. Il constitue un inhibiteur actif contre de nombreux micro-organismes, qu'il s'agisse de bactéries ou de moisissures. Son action inhibitrice est accrue en milieu acide (Mathot et al., 1996). Les bactéries Gram-négatives étant plus sensibles que les bactéries Gram-positives. Le diacétyl est produit par certaines souches notamment des souches de Leuconostoc, Lactococcus, Pediococcus et Lactobacillus. (Caplice& Fitzgerald, 1999)

1.5.4. Acides organiques

L'acide lactique est le Métabolite majeur des bactéries lactiques qui induit une acidification du milieu limitant ainsi la prolifération des micro-organismes (Schnürer et Magnusson, 2005). Le métabolisme des bactéries lactiques entraîne une production significative d'acides organiques. Ces acides peuvent être synthétisés soit par des bactéries homofermentaires, soit par des bactéries hétérofermentaires. Chez les premières, le pyruvate est principalement converti en acide lactique, tandis que chez les secondes, il donne naissance à divers composés tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, ainsi que de l'éthanol et du dioxyde de carbone. (Liu, 2003).

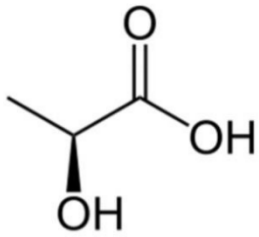


Figure 08 : Représentation schématique de l'acide lactique (Good Beer Solutions. (n.d.). Acide lactique 80% FG FCC E270. Retrieved March 20, 2025, from.)

Les acides organiques faibles, tels que l'acide lactique et l'acide acétique, jouent un rôle clé dans la préservation des aliments en inhibant la croissance des bactéries pathogènes. Leur activité antimicrobienne repose principalement sur leur état non dissocié, qui leur permet de traverser la membrane plasmique des micro-organismes. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces acides se dissocient en réponse au pH intracellulaire plus élevé, entraînant une accumulation d'ions et une perturbation de l'homéostasie du pH. Ce mécanisme peut provoquer soit un effet

bactériostatique, en ralentissant la croissance microbienne, soit un effet bactéricide, en menant à l'inactivation des cellules pathogènes. En raison de ces propriétés, les acides organiques sont largement utilisés comme agents de conservation dans l'industrie agroalimentaire. (Brul& Coote,1999).

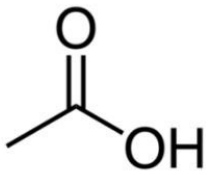


Figure 09 : Représentation schématique de l'acide acétique (France Minéraux, n.d.)

1.5.5. Bactériocines

I.5.5.1. Définition

Le terme < bactériocine > fut utilisé pour la première fois en 1964 par André Lwoff, médecin et biologiste français (Dillenseger, 2019). Les bactériocines sont des complexes protéiques dotés d'une activité bactéricide ciblant des espèces proches de la souche productrice. Il s'agit de peptides antimicrobiens, composés de 20 à 60 acides aminés, synthétisés via la voie ribosomique. Leur production est régulée par des clusters génétiques spécifiques, impliquant une ou plusieurs unités de transcription, et elles sont produites aussi bien par les bactéries à Gram positif et négatif que par les archées. (Sidhu et Nehra, 2017)

Les bactériocines ne sont pas classées parmi les antibiotiques, bien qu'elles possèdent une activité antimicrobienne pouvant être soit bactéricide, soit bactériostatique. Elles se distinguent des antibiotiques par leur mode de synthèse ribosomale, contrairement aux antibiotiques qui sont issus de voies de biosynthèse enzymatiques. De plus, elles agissent à des concentrations bien plus faibles et présentent généralement un spectre d'activité plus restreint. (Mekri,2016)

I.5.5.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines se différencient par leur structure, leur conformation, leur mode de sécrétion et leur mécanisme d'action, ce qui permet leur classification en quatre classes selon Klaenhammer (1993) :

- **Classe I - Les lantibiotiques**

Les lantibiotiques tels que la nisine et la mersacidine illustrées ci-dessous sont de petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables, caractérisés par la présence d'acides aminés modifiés post-traductionnellement, tels que la lanthionine et la méthyl-lanthionine. Ce sont des protéines de faible masse moléculaire (<10 kDas) qui subissent des modifications structurales lors de leur biosynthèse, facilitée par une séquence signal permettant leur reconnaissance et transport sous une forme inactive. Selon leur charge et leur structure, ils sont classés en trois sous-groupes : Ia, constitués de peptides cationiques hydrophobes contenant environ 34 acides aminés ; Ib, regroupant des peptides globulaires neutres ou chargés négativement avec jusqu'à 19 acides aminés ; et Ic, caractérisés par une structure cyclique formée de deux peptides agissant en synergie. (Mekri, 2016 ; Gonzalez-perezet al., 2018)

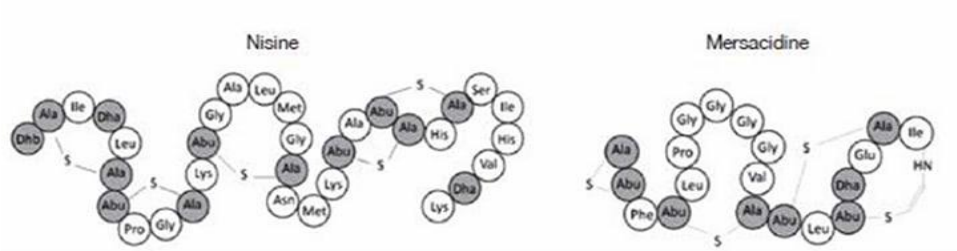


Figure10 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisine) et B (mersacidin) (Dortu et Thonart, 2009).

- **Classe II : les peptides non modifiés**

Certaines bactériocines appartiennent à une catégorie dépourvue de cycles de lanthionine. Elles sont caractérisées par leur petite taille (<10 kDas) et leur stabilité thermique. Ces peptides ne subissent aucune modification post-traductionnelle et exercent leur action principalement en augmentant la perméabilité de la membrane interne, entraînant une perte des métabolites essentiels et, par conséquent, la mort de la cellule bactérienne. Bien qu'elles partagent certaines propriétés, ces bactériocines se répartissent en plusieurs familles présentant des structures et des modes d'action variés. (Cherier, 2017) Les bactériocines de la classe IIa possèdent un pont disulfure en C-terminal, renforçant leur stabilité. Celles de la classe IIb nécessitent deux peptides pour être actives : en type E, ils amplifient leur effet, tandis qu'en type S, ils agissent de manière complémentaire. La classe IIc regroupe celles qui ne rentrent pas dans ces catégories, comme la plantaricine A et la lactococcine A. (Dillenseger, 2019)

- **Classe III : Bactériolysines**

Ces bactériocines sont des protéines de plus de 30 kDa, thermosensibles. Leur structure et leur mécanisme d'action se distinguent nettement de ceux des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. (Nigutova et al. 2007). Cette catégorie comprend quatre bactériocines majeures : l'helveticine, l'enterolysine A, la zoocine A et la milléricine B. Elles sont produites respectivement par Streptococcus zooepidemicus, Streptococcus helveticus et Lactobacillus milleri. (Djelloul, 2021).

- **Classe IV : Bactériocines complexes**

Les bactériocines de la classe IV regroupent des peptides nécessitant des composants non protéiques, tels que des glucides ou des fractions lipidiques, pour leur activité antimicrobienne. Proposée par Klaenhammer en 1993, cette classification reste encore peu caractérisée sur le plan biochimique, en raison du manque d'informations détaillées à son sujet. (Guessas, 2007)

I.5.5.3. La biosynthèse des bactériocines

La production des bactériocines débute généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Leur concentration peut être réduite en raison de l'action des protéases produites par les bactéries lactiques ou de leur adsorption à la surface cellulaire. Ces peptides antimicrobiens sont d'abord synthétisés sous forme de pré-peptides inactifs qui subissent ensuite des modifications post-traductionnelles pour devenir actifs. Leur synthèse est souvent contrôlée par un mécanisme de Quorum Sensing et influencée par plusieurs paramètres tels que la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et les conditions de fermentation. (Tahlaiti, 2019)

I.5.5.4. Mode d'action de bactériocine

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009) se classent en deux catégories : celles ayant un effet bactéricide, avec ou sans lyse cellulaire, et celles ayant

un effet bactériostatique, inhibant la croissance des bactéries cibles. Leur action repose soit sur l'altération de la perméabilité membranaire, soit sur l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, soit encore sur la rupture des liaisons peptidiques au sein de la paroi bactérienne. (Nes et al., 2011)

Les lantibiotiques, appartenant à la classe I des bactériocines, interagissent avec les membranes cellulaires via des interactions électrostatiques ou en se fixant à des récepteurs spécifiques. Cette interaction favorise la formation de pores larges et non sélectifs à la surface des cellules cibles, entraînant une fuite rapide des composants intracellulaires tels que les ions, l'ATP et les acides aminés, ce qui augmente la perméabilité membranaire et conduit à la destruction bactérienne. Les bactériocines de classe II exercent une action similaire en induisant une perméabilisation membranaire qui provoque la mort cellulaire. En revanche, les bactériocines de classe III adoptent un mécanisme distinct en hydrolysant les liaisons peptidiques des peptidoglycanes de la paroi bactérienne. Le spectre d'action de ces molécules varie en fonction du nombre de bactéries sensibles : certaines présentent une activité restreinte, comme la zoocine A, tandis que d'autres ont un spectre plus large, à l'image de l'entérocine A et de la milléricine. (De freireBastos et al., 2015 ; Bali et al., 2016 ; Tenea et Yépez,2016)

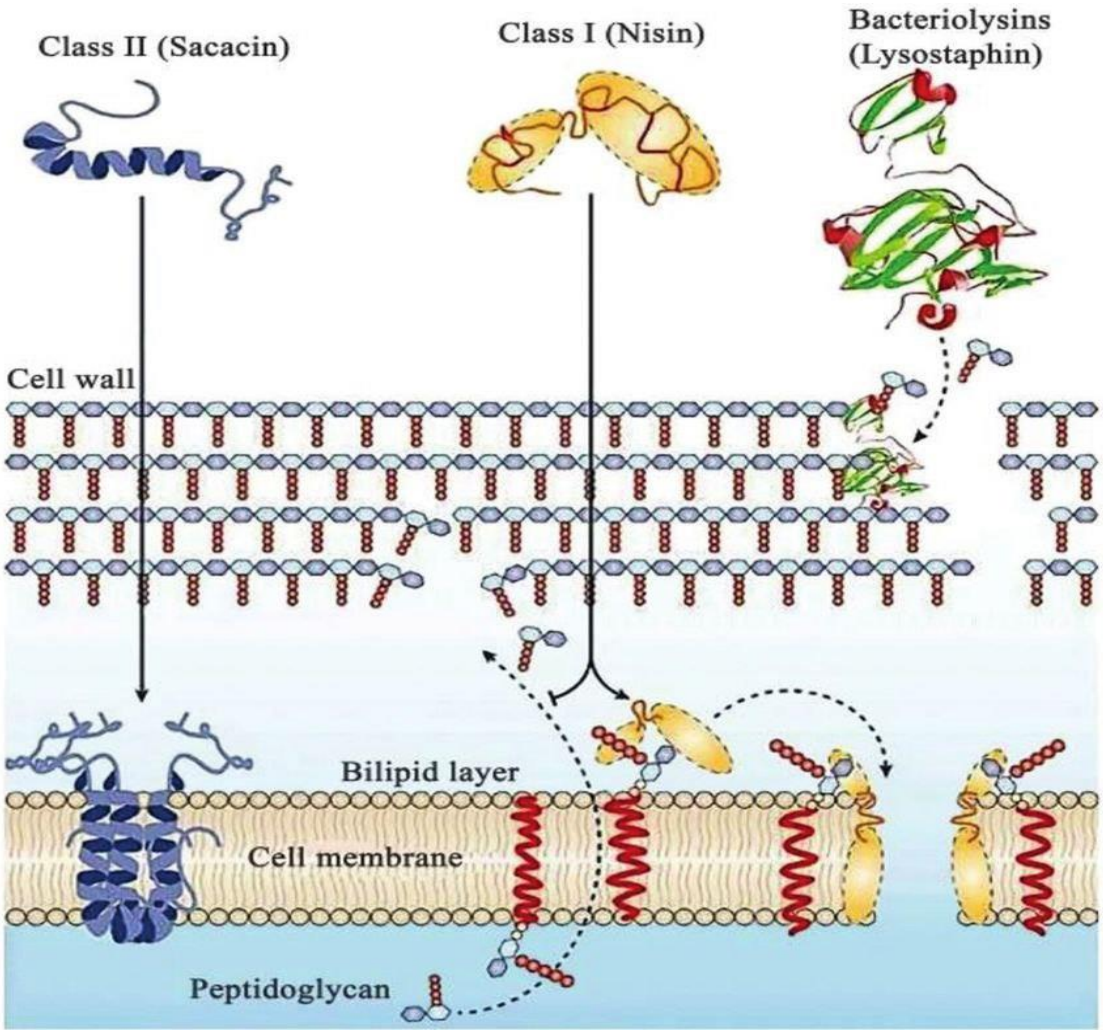


Figure 11 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Asyakina, L. K., et al.,2020)

I.6. Bactéries lactiques et fermentation alimentaire

La fermentation, l'une des plus anciennes méthodes biotechnologiques employées dans la fabrication alimentaire, est désormais intégrée aux processus fondamentaux de l'industrie alimentaire (Zapaśnik, A. et al., 2022) d'autre part, Les bactéries lactiques (LAB) constituent un vaste groupe de bactéries étroitement liées, partageant des caractéristiques communes, notamment la capacité à produire de l'acide lactique, lequel représente un produit final de la fermentation. L'une des raisons prépondérantes justifiant la pratique de la fermentation utilisant les bactéries lactiques est d'accroître l'appétence des aliments tout en améliorant leur qualité, notamment en augmentant la disponibilité des protéines et des vitamines. Par ailleurs, les LAB confèrent également des propriétés conservatrices et détoxifiantes aux denrées alimentaires.

(Chelule et al.,2010) aussi, Les LAB sont cruciaux car, durant les phases de croissance et de fermentation, ils génèrent une variété de métabolites aux propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites incluent le peroxyde d'hydrogène, l'acide lactique, l'acide acétique ainsi que des substances de faible masse moléculaire, des composés antifongiques et des bactériocines. (Zapaśnik, A. et al., 2022).

La fermentation améliore la qualité nutritionnelle et organoleptique des aliments en augmentant leur teneur en acides aminés essentiels et en enrichissant saveur et arômeDes études ont montré que les aliments fermentés ont une qualité supérieure et une teneur nutritionnelle plus élevée que les aliments non fermentés, principalement en raison de la présence de micro-organismes bénéfiques. (Ahansaz, N., et al. 2023)

Parmi les produits alimentaires fermentés par les bactéries lactiques, on retrouve le kéfir, le fromage, le beurre, la choucroute, les légumes marinés, le pain au levain, ainsi que divers produits laitiers fermentés. Ces derniers résultent de l'action d'un consortium de bactéries lactiques responsables du caillage et de l'acidification du lait. (Ayivi et al., 2020)

1.7. Bactéries lactiques et santé humaine

Les bactéries lactiques sont essentielles dans les processus de fermentation alimentaire, favorisant une conservation accrue et offrant des avantages tels que la saveur et texture, la consistance ainsi que des impacts bénéfiques sur la santé. Dans ce domaine, les groupes bactériens les plus familiers comprennent L. lactis, S. thermophilus, ainsi que plusieurs espèces de lactobacilles et Leuconostoc. (Pierre Renault, 2008) Dominant ainsi la flore vaginale, ils jouent un rôle protecteur contre les infections et contribuent à l'équilibre de la flore intestinale en colonisant les muqueuses buccales et rectales. De plus, on observe une utilisation fréquente des lactobacilles dans le domaine des probiotiques. (P. tailliez ,2004) L'ingestion de ferments lactiques peut neutraliser les effets d'une prolifération de certaines souches pathogènes. Pour ce faire, les bactéries lactiques ou les enzymes doivent franchir sans subir de dommages irréversibles la barrière acide de l'estomac, puis résister à l'action inhibitrice des sels biliaires. (Michel ,1996)

II. Abeilles

II .1. Généralités et caractéristiques des abeilles

Les abeilles sont des insectes domestiques et aussi sauvages,Plus de 750000 espèces, représentant une plus grande diversité du monde animal. Parmi les nombreux taxons d'insectes,

l'ordre des hyménoptères et la famille des apidés se distinguent par leur capacité à piquer.Les abeilles productrices de miel font déjà partie des résidents les plus anciens de notre planète. Il est en perpétuel développement depuis son apparition au cours du Crétacé, il y a plus de cent millions d'années. (SPÜRGIN, A. 2010, Laure cailloce, 2016)

L'abeille possède un système sensoriel hautement évolué. Il est possible d'affirmer que ce sont ces organes hautement spécialisés qui lui confèrent une performance aéronautique remarquable : Surveillance de la consommation de carburant, évaluation de la vitesse du vent et de vol, mesure des champs magnétiques et électriques, gravité terrestre. (SPÜRGIN, A. 2010). Assurent un rôle déterminant dans la pollinisation des plantes à fleurs, garantissant ainsi la reproduction de multiples espèces végétales. Se nourrissant essentiellement de nectar et de pollen. Le nectar sert principalement à fournir des glucides pour soutenir l'énergie et les processus métaboliques, alors que le pollen représente la source principale de tous les autres macronutriments et micronutriments. (Laure cailloce, 2016, María Alejandra 2022)

II.1.1. Anatomie et physiologie de l'abeille

Comme tous les hyménoptères, I 'abeille mellifère a un corps divisé en trois parties : tête, thorax et abdomen, Les segments de la tête et du thorax sont plutôt fixes, tandis que l'abdomen est très mobile. (SPÜRGIN, A. 2010)

1. La tête : sur la tête nous distinguons comme le montre la figure I. Ce segment a une fonction sensorielle et alimentaire. Il comprend les antennes, les yeux et l'appareil buccal (Agnès Fayet ,2015) :

Les yeux : une paire des yeux composés permettant de percevoir les grandes distances et trois yeux simples (ocelles) qui lui donnent la capacité de distinguer ce qui est à proximité.

Les antennes : elles offrent à l'abeille la capacité de toucher, de goûter, de percevoir et communiquer entre elles.

L'organe buccal : il comprend la trompe entourée de deux mandibules, en plus de la langue qui sert à aspirer le nectar du fond de la corolle florale, se nourrir de miel et s'hydrater avec de l'eau. (Michel Girdwoyn ,1876)

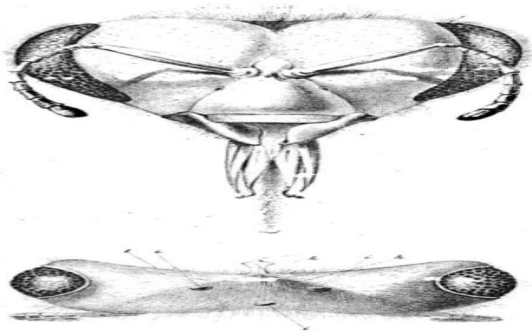


Figure 12 : Tête et yeux simple d'une abeille ouvrière (Michel Girdwoyn ,1876)

1. Thorax D'après Michel (1876), le thorax se compose de trois parties nommées prothorax, mésothorax et métathorax. Le thorax de l'abeille permet son mouvement grâce à trois paires de pattes et deux paires d'ailes.
    - Le prothorax ce segment porte la première paire de pattes (pattes antérieures).
    - Le mésothorax. Ce segment porte la seconde paire de pattes (pattes médianes) et la première paire d'ailes (ailes antérieures).
    - Le métathorax. Ce segment porte la troisième paire de pattes (pattes postérieures) et la seconde paire d'ailes (ailes postérieures). (Agnès Fayet ,2015)

    Pattes : chaque duo de pattes à une fonction spécifique : la patte avant sert à nettoyer les antennes, tandis que les pattes médianes et arrière sont modifiées chez l'ouvrière pour la collecte du pollen. (Michel Girdwoyn ,1876)



Figure 13 : Des pattes de l'abeille (Michel Girdwoyn ,1876)

Ailes : l'abeille dispose aussi de deux pâmes d'ailes membraneuses attachées au thorax et qui opèrent grâce à un système complexe. Les ailes avant sont plus grandes et plus évoluées que les ailes arrière. Elles opèrent toujours de manière simultanée.

L'abdomen : Toutefois, il possède des bandes plus claires à la base de chaque segment. L'abdomen joue un rôle crucial dans la reproduction et renferme les principaux organes vitaux tels que les organes reproducteurs, les organes du système respiratoire, les organes digestifs ainsi que l'appareil vulnérant. (Agnès Fayet ,2015)

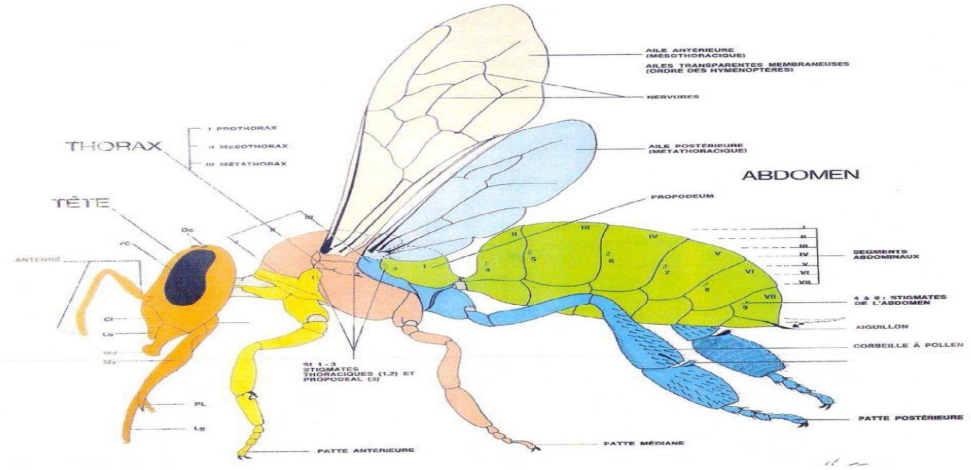


Figure 14 : morphologie de l'abeille (Gilles A., 2010)

II.1.2. Caste d'abeille

On emploie généralement le concept de caste pour caractériser les groupes d'individu définis selon leur statut reproductif. Chez l'abeille domestique, on distingue trois Castes. La reine, les ouvrières et les faux-bourdons. (RASOLOFOARIVAO ,2014)

a) La reine : Elle possède des ovaires bien développés, un attribut à associer à sa fonction de ponte. De plus, elle a une taille plus importante, surtout au niveau de l'abdomen, et bénéficie d'une longévité notable. Son alimentation est exclusivement basée sur la gelée royale.

b) Les abeilles ouvrières : elles assument plusieurs tâches tout au long de leur existence, telles que la maintenance de la ruche, l'alimentation des larves, la construction des rayons, le stockage et la collecte du pollen. Leur durée de vie étant brève, elles sont nourries par un mélange de gelée royale et de pain d'abeilles. (Boudon B, 2019)

c) Les faux bourdons, également appelés mâles : ces derniers participent à la ventilation et à la préservation de la chaleur dans le nid. Ils ne piquent que dans un

but défensif, pour se protéger eux-mêmes ou leur nid. N'a pas de glandes cireuses et ne possède aucun mécanisme à la collecte du pollen. (Van alphen 2024 ; William 2010)

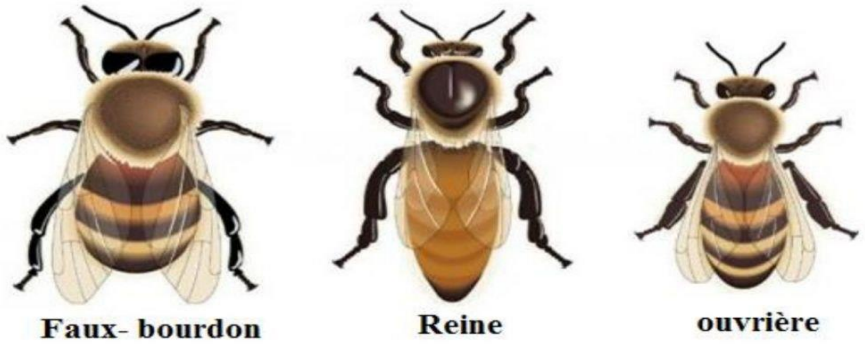


Figure 15 : Schéma des 3 castes de l'abeille

II.2. Effets bénéfiques sur la santé et la conservation des aliments

Le miel possède de puissantes propriétés antibactériennes grâce à son acidité, sa forte teneur en sucre et des composés comme le peroxyde d'hydrogène. Ces éléments le rendent efficace contre les bactéries résistantes. Le miel favorise la digestion, agit comme un laxatif doux, et aide à réduire les nausées et l'indigestion. En cas de gastro-entérite bactérienne, il améliore la réhydratation et réduit la diarrhée tout en favorisant l'absorption du potassium. (Cuvillier, 2015)

Les antioxydants sont des composés naturels présents dans divers types de miel, jouant un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydatif. Ils contribuent également à la stabilité des produits alimentaires en préservant leurs propriétés organoleptiques, notamment la couleur et le goût." (Doukani et al., 2014).

La propolis possède de puissantes propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antivirales et anticancéreuses. Elle est efficace contre de nombreuses bactéries, notamment les Staphylococcus et Helicobacter pylori, grâce à sa richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques. Son activité antifongique a été prouvée contre plusieurs espèces de Candida. Elle combat aussi les virus comme l'herpès et la grippe, et son composé CAPE agit comme un inhibiteur du VIH. Enfin, la propolis aide à soulager les troubles digestifs et pourrait avoir un effet cytotoxique sur certaines cellules tumorales. (Cuvillier, 2015), La propolis présente une activité inhibitrice contre diverses bactéries pathogènes telles que Staphylococcus aureus,

Streptococcus mutans, Escherichia coli, Helicobacter pylori, Listeria, et Salmonella. Ces souches sont impliquées dans plusieurs infections touchant les voies respiratoires, le système gastro-intestinal, les organes génitaux et la cavité buccale (Cardinault et al., 2012).

Les antioxydants contribuent à la préservation des aliments en retardant les processus d'oxydation, ce qui permet de maintenir leur fraîcheur, couleur et valeur nutritionnelle plus longtemps. En stabilisant les espèces réactives oxygénées, ils aident à prévenir la détérioration des aliments et prolongent leur durée de conservation (Meda et al., 2005).

La gelée royale possède des propriétés antibactériennes grâce à la royalisine et à l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque, efficaces contre des bactéries comme Staphylococcus aureus et E. coli. Elle stimule aussi le système immunitaire et aide à restaurer la flore intestinale après un traitement antibiotique. En tant qu'adaptogène, elle renforce l'organisme face aux agressions extérieures, notamment en hiver. De plus, sa richesse en antioxydants protège les cellules du vieillissement, et ses propriétés anti-inflammatoires réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires. (Cuvillier, 2015), La gelée royale a des effets inhibiteurs in vitro sur plus de 150 bactéries, plusieurs champignons et virus (Mateescu, 2016)

Le pollen d'Apis mellifera est une source riche en polyphénols et flavonoïdes, reconnus pour leur puissant effet antioxydant. Ces composés jouent un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, contribuant ainsi à la prévention du vieillissement cellulaire et de diverses pathologies liées au stress oxydatif, notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète et le cancer (Carpes et al., 2009).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Lieu et objectif

L'étude a été réalisée entre mars et mai 2025 au laboratoire de microbiologie, un laboratoire pédagogique de l'Université Yahia Farès de Médéa. Les objectifs spécifiques de ce travail sont d'isoler des souches de bactéries lactiques à partir de sources naturelles, de les identifier et de les caractériser à l'aide de tests biochimiques et microbiologiques, puis d'évaluer l'activité antimicrobienne des métabolites qu'elles produisent vis-à-vis de différentes bactéries pathogènes de référence.

2. Matériel

2.1. Matériels biologiques

La partie expérimentale a été réalisée à l'aide du matériel biologique suivant :

2.2. Les souches de références

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des souches lactiques, cinq (05) souches de référence ont été utilisées (voir tableau) : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas Spp*. Ces souches nous ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Alger.

Tableau 03 : Liste des microorganismes testés.

Souches bactériennes	Code	Gram
Staphylococcus aureus	*ATCC25923*	Positive
Escherichia coli	*ATCC25922*	Négative
Salmonella spp		Négative
Bacillus cereus	*ATCC11778*	Positive
Pseudomonas spp	*ATCC27853*	Négative

ATCC: American Type Culture Collection.

2.3. Matériel non biologique

Milieux de culture et Appareillage (Annexe).

3. Méthodes

3.1. Réactivation et vérification de la pureté des souches de référence

La revivification des souches pathogènes a été effectuée par culture dans des milieux liquides spécifiques, adaptés à chaque type de souche. La croissance bactérienne a été mise en évidence par le trouble du milieu de culture.
La vérification de la pureté des souches a ensuite été réalisée par ensemencement en stries sur divers milieux sélectifs et différentiels : Chapman, Hektoen, Cétrimide, MacConkey, GSS, GN et Mueller-Hinton. L'incubation a été menée à 37 °C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à l'obtention de colonies homogènes en termes de forme, de taille et de couleur, conformément à la méthode décrite par Idoui et al. (2009).

Pour confirmer la pureté des isolats, des tests à la catalase ont été effectués, accompagnés d'observations macroscopiques et microscopiques.

3.2. Conservation des souches pathogènes

Nous avons utilisé la technique de cryoconservation à basse température pour préserver les cultures microbiennes. Les souches ont été suspendues dans un milieu cryoprotecteur, constitué d'un bouillon nutritif enrichi en glycérol à 30 %, puis conservées par congélation à -20 °C ou à une température inférieure. Le glycérol agit en tant qu'agent cryoprotecteur, en empêchant la formation de cristaux de glace susceptibles d'endommager les structures cellulaires, assurant ainsi la viabilité des micro-organismes à long terme (Bio-Rad, 2011).

3.3. Isolement et identification des bactéries lactiques

3.3.1. Échantillonnage

Nous avons sollicité un apiculteur afin d'obtenir une quantité d'abeilles adultes, qu'il a soigneusement placées dans des boîtes de Petri stériles afin d'éviter toute contamination externe. Les échantillons ont été prélevés à partir d'abeilles adultes provenant de trois régions géographiques distinctes, dans le but d'isoler les bactéries lactiques qui leur sont associées. Les sites de collecte étaient les suivants : El Guelb El Kébir, dans la wilaya de Médéa (le 24 février 2025), Béni Slimane, également dans la wilaya de Médéa (le 11 mars 2025), et la wilaya de Blida (le 15 mars 2025).

3.3.2. Préparation de l'échantillon

Dans des conditions aseptiques, sous une hotte à flux laminaire équipée d'une lampe à ultraviolets, nous avons manipulé les abeilles adultes afin de prélever leur microbiote intestinal. Les abeilles ont été euthanasiées, puis les intestins ont été extraits à l'aide de pinces stériles. Ces derniers ont ensuite été soigneusement lavés avec de l'eau physiologique stérile, puis placés dans différents milieux de culture liquides : bouillon MRS (pH 5,4 et 5,8), milieu Rogosa (pH 5,4), Esty brothe et milieu Eliker (pH 6,8). Un millilitre d'huile de vaseline a été ajouté à chaque tube afin de favoriser la croissance des bactéries lactiques en créant des conditions micro aérobies.

Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Le développement bactérien s'est manifesté par un trouble du milieu. Par la suite, 1 ml du mélange a été prélevé aseptiquement et dilué dans 10 ml d'eau distillée stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées (de 10^{-1} à 10^{-8}). Un volume de 1 ml des dilutions appropriées (10^{-5}, 10^{-6} et 10^{-7}) a été ensemencé en stries sur les milieux de culture précités, puis incubé en anaérobiose à 37 °C pendant 24 à 72 heures.

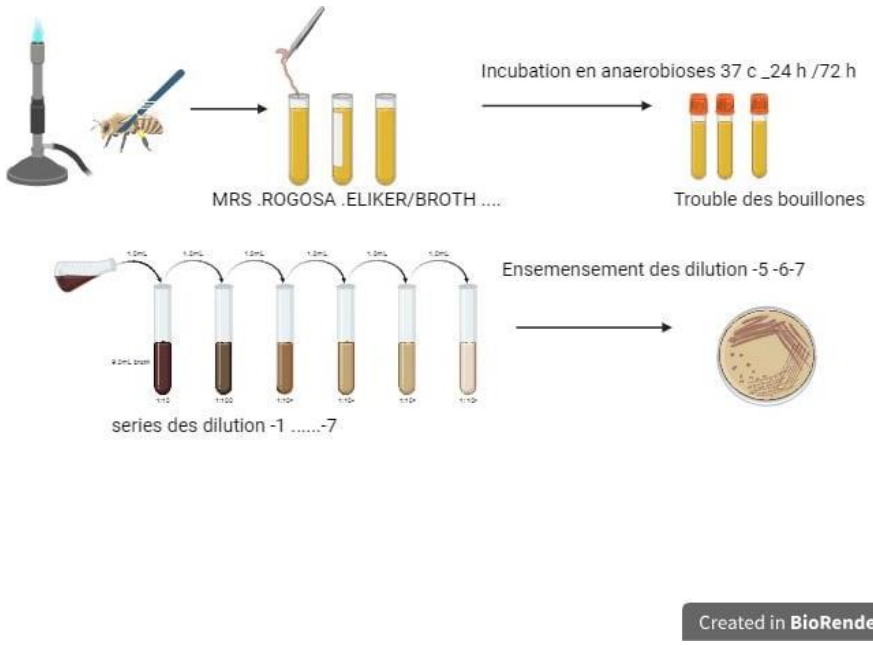


Figure 15 : le méthode d'extraction et isolement des bactéries à partir des abeilles

3.3.3. Identification phenotypiques

Les isolats présentant une réaction catalase négative, une coloration de Gram positive et une morphologie distincte (taille, forme, couleur) ont été sélectionnés. Ces isolats ont ensuite été purifiés par repiquages successifs dans les bouillons de culture, suivis d'un ensemencement en stries sur les mêmes milieux gélosés que ceux utilisés pour l'isolement initial. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 24 heures, jusqu'à l'obtention de colonies pures (Bouchibane, 2023).

3.3.3.1. Examen macroscopique

Il s'agit d'une observation visuelle des colonies bactériennes développées à la surface des milieux solides MRS et M17, visant à évaluer et caractériser divers critères morphologiques (Badis et al., 2005), notamment :

- La forme des colonies : circulaire, ponctiforme, ondulée, érodée ;
- Le contour : régulier ou irrégulier ;
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente ;
- L'élévation : convexe, concave, plate ou à centre surélevé ;
- La surface : lisse, rugueuse, sèche ou dentelée ;
- La taille : grande, moyenne ou petite.

3.3.3.2. Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement ×100 a permis de classer les bactéries selon leur réaction à la coloration de Gram (Gram positif ou négatif), leur morphologie cellulaire (coques ou bacilles) ainsi que leur mode d'association. Cette observation a été réalisée à partir de frottis bactériens préparés à partir de colonies suspectes issues de cultures pures.

- **Coloration de Gram**

  La coloration de Gram a été réalisée après l'examen macroscopique des colonies sur gélose, dans le but d'éliminer les isolats potentiellement non purs. Cette étape permet de confirmer la nature des souches et de sélectionner celles présentant des caractéristiques compatibles avec les bactéries lactiques. La méthode utilisée suit le protocole décrit par **Camille (2014)** (Annexe II).

3.3.4. Identifications biochimiques et physiologiques

3.3.4.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2). Selon le principe de la réaction, la présence de catalase se manifeste par un dégagement immédiat de bulles d'oxygène au contact du peroxyde d'hydrogène.

$$H_2O_2 \longrightarrow \frac{1}{2} O_2 + H_2O$$

À l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie bactérienne est prélevée puis déposée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée à 3 %) placée sur une lame propre. L'apparition immédiate de bulles d'oxygène indique une réaction positive, révélant la présence de catalase. En revanche, les bactéries lactiques sont généralement catalase-négatives, ce qui se traduit par l'absence de bulles (Hassaine et al., 2013).

3.3.4.2. Test oxydase

Le test à l'oxydase est utilisé pour détecter la présence de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. Pour ce faire, une goutte de réactif d'oxydase est déposée sur une lame propre, puis une petite quantité de culture bactérienne est appliquée à l'aide d'un bâtonnet stérile. Après 10 à 30 secondes, l'apparition d'une coloration bleue ou violet indique un résultat positif. En l'absence de changement de couleur, le résultat est considéré comme négatif. Ce test permet ainsi de distinguer les bactéries oxydase-positives des oxydase-négatives (Vinderola, O'Rourke & Fox, 2010).

3.3.4.3. Test de croissance à différente Température

L'évaluation de la croissance à différentes températures ainsi que de la thermo résistance permet d'analyser la capacité d'adaptation des isolats à diverses conditions thermiques (4, 30, 37 et 45 °C). Pour cela, les souches sont ensemencées dans des bouillons MRS ajustés à un pH de 6,8. L'incubation est effectuée pendant une semaine à 4 °C, et pendant 24 à 72 heures pour les autres températures. La croissance bactérienne est évaluée par comparaison avec un tube témoin non ensemencé. Le développement des souches est mis en évidence par la turbidité du milieu, indiquant un trouble caractéristique (Larpent, 1996).

3.3.4.4. Test de croissance à différente PH

L'évaluation de la croissance à différents pH (4 et 9) permet d'analyser la capacité d'adaptation des bactéries lactiques à des conditions acides et basiques. Pour cela, les souches sont ensemencées dans des bouillons MRS dont le pH a été préalablement ajusté aux valeurs souhaitées. La croissance bactérienne est ensuite déterminée par l'observation de la turbidité du milieu, signe du développement des souches (Guessas & Kihal, 2006 ; Rouisset & Bensoltane, 2006).

3.3.4.5. Test de croissance dans NaCl

L'étude de la croissance en présence de NaCl permet d'évaluer la tolérance osmotique des bactéries lactiques, généralement sensibles aux environnements fortement salins. Pour cela, des milieux liquides MRS et M17, ajustés à un pH de 6,5, sont préparés avec différentes concentrations de NaCl (1 %, 2 %, 3 % et 6,5 %), puis ensemencés avec les souches testées (Carr et al., 2002). Après incubation à 37 °C pendant 24 à 72 heures, la croissance bactérienne est évaluée par observation de la turbidité, en comparaison avec des tubes témoins non ensemencés. Cette méthode permet ainsi de déterminer la capacité d'adaptation des isolats à des conditions salines (Badis et al., 2005).

3.3.4.6. Test de la Recherche le type fermenter

Ce test permet de mettre en évidence la production de CO_2 à partir du glucose, afin de différencier les bactéries lactiques hétérofermentaires des homofermentaires. À cet effet, un milieu MRS, muni d'une cloche de Durham, est inoculé avec une colonie à tester, puis incubé à 37 °C pendant 72 heures. L'accumulation de gaz dans la cloche indique la production de CO_2, témoignant ainsi d'un métabolisme hétérofermentaires. En l'absence de gaz, la souche est considérée comme homofermentaire.

3.3.4.7. Test de la Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

L'enzyme étudiée, l'arginine dihydrolase (ADH), catalyse la libération d'ammoniac et de citrulline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, des tubes de bouillon Moeller contenant de l'arginine sont ensemencés, ainsi qu'un tube témoin dépourvu d'arginine. Tous les tubes sont recouverts d'huile de vaseline stérile afin d'assurer des conditions anaérobies, puis incubés à 30 °C pendant au moins quatre jours. Les souches exprimant l'ADH commencent

par fermenter le glucose, ce qui entraîne une acidification du milieu (virage au jaune). Cette acidification active ensuite l'enzyme, qui dégrade l'arginine et libère de l'ammoniac, provoquant un changement de couleur du milieu vers le violet (Gelman et al., 2000).Ce test a également été réalisé à l'aide de la galerie API 20 E. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'apparition d'un virage colorimétrique — d'abord jaune, puis violet — confirme la présence de l'arginine dihydrolase.

3.3.4.8. Test d'utilisation de citrate

Chaque culture fraîche âgée de 18 heures a été inoculée dans un milieu au citrate de Simmons, qui utilise le citrate comme unique source de carbone, afin d'évaluer la capacité des isolats à métaboliser ce composé. Après une incubation à 37 °C pendant 5 à 7 jours, la croissance bactérienne ainsi qu'un changement de couleur du milieu du vert au bleu a été observés. Ce virage colorimétrique indique une activité positive du métabolisme du citrate (Bouchibane, 2023).

3.3.4.8. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque. Les cultures bactériennes, après une incubation nocturne, ont été ajustées à une densité optique appropriée pour chaque espèce. Un volume de 100 µL de chaque suspension a été uniformément réparti sur la surface de la gélose MRS à l'aide d'un écouvillon stérile. Par la suite, des disques imprégnés des antibiotiques suivants ont été déposés sur la surface du milieu gélosé : Amoxicilline, Gentamicine, Spiramycine, ciprofloxacine, Doxycycline et amoxicilline associée à l'acide clavulanique. Chaque boîte de Pétri a reçu six disques antibiotiques. Les plaques ont été maintenues à 4 °C pendant 30 minutes afin de favoriser la diffusion des antibiotiques dans le milieu, puis incubées à 37 °C pour une durée de 24 à 48 heures. La sensibilité des souches bactériennes a été déterminée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition formées autour de chaque disque antibiotique. Les résultats ont été interprétés selon les critères suivants : Sensible (S) : diamètre d'inhibition ≥ 21 mm Intermédiaire (I) : diamètre compris entre 16 et 20 mm et Résistant (R) : diamètre ≤ 15 mm **(Mulaw *et al*., 2019).**

4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Les souches de bactéries lactiques ont été testées pour leur activité antibactérienne à partir de cultures jeunes en phase exponentielle de croissance, contre cinq souches pathogènes de

référence : *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.Le principe de détection de l'activité antimicrobienne repose sur la diffusion de substances antimicrobiennes dans des milieux de culture solides, entraînant l'inhibition de la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles. La mise en évidence de cette activité a été réalisée sur des souches représentatives présentant un intérêt particulier.

Les souches démontrant une activité inhibitrice ont été soumises à des tests d'antagonisme indirects, notamment la méthode des puits, conformément à la technique décrite par Izquierdo et al. (2009). Afin de confirmer le potentiel antagoniste de nos six souches lactiques, deux approches complémentaires ont été utilisées : la méthode des puits et celle des disques.

- **Préparation des suspensions bactériennes**

Pour réaliser les tests d'antagonisme, des précultures jeunes des souches lactiques (productrices) et pathogènes (indiciatrices) ont été préparées. À partir des boîtes de Pétri contenant les milieux solides (gélose MRS, Rogosa, gélose nutritive, etc.), chaque souche a été ensemencée dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieux liquides appropriés (bouillons MRS, Rogosa, Eliker, Esty Broth ou bouillon nutritif), puis incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures.La standardisation des suspensions des souches indicatrices a été effectuée par dilution dans de l'eau physiologique stérile, de manière à obtenir une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 à 600 nm (DO600), correspondant à une concentration bactérienne standardisée.

4.1. Méthode des disques

Le milieu Mueller-Hinton est coulé dans des boites de Pétri stériles, après Solidification du milieu, les boites sont ensemencées en surface par la suspension des souches pathogènes avec un écouvillon stérile, les disques de papiers Wattman stériles de 6 mm de diamètre sont ensuite déposés sur le milieu de culture (six disques : un disque pour chaque souche de bactéries lactiques), chaque disque reçoit un volume de 10 µl de la suspension des bactéries lactiques. Une fois les boites sont échées à température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h L'`inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques et les diamètres des zones sont mesurés (Shehata et al., 2016)

4.2. Méthode des puits

L'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées a été analysée en appliquant la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé, conformément au protocole établi par Pradhan et al. (2023). À cet effet, des boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton ont été ensemencées en surface avec une suspension bactérienne standardisée (0,5 McFarland) des souches indicatrices. Des puits de 6 mm de diamètre ont été générés à l'aide d'un poinçon stérile, puis remplis avec 100 µL du surnageant cellulaire exempt de cellules, obtenu après centrifugation à 8000 tr/min pendant 10 minutes, suivie d'une filtration stérile à 0,22 µm. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits a été interprétée comme une indication de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, et le diamètre de cette inhibition a été mesuré en millimètres afin de quantifier l'effet inhibiteur. Cette approche expérimentale permet de caractériser l'effet antimicrobien des bactéries lactiques sur des pathogènes spécifiques et contribue à la compréhension de leur potentiel d'application en microbiologie alimentaire et médicale.

4.3. Test d'activité Antimicrobienne par méthode des 《 cylindre d'agar)

Des souches des bactéries lactiques isolées à partir d'échantillons d'abeilles ont été cultivées sur les déférentes bouillons MRS, Rogosa, Eliker…, et incubées à37°C pendant 24 h afin d'assurer une croissance optimale. Des fragments d'agar (« plugs ») de 6 mm de diamètre, contenant les colonies en croissance, ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé. Ces plugs ont ensuite été placés directement sur la surface de boîtes de Petri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé avec les bactéries pathogènes cibles en phase exponentielle. Les boites ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'apparition de zones d'inhibition autour des Plugs a été observée et mesurée en Millimètres pour évaluer l'activité Antimicrobienne des 6 souches des bactéries lactiques Testées (Radhika et al., 2011).

5. Détermination du métabolite inhibiteur des bactéries lactiques

- **Étape 1 : Préparation du surnageant**

Une culture jeune (18 h) a été préparée en repiquant les souches dans un flacon contenant 20 à 30 ml de milieu MRS. Après incubation, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 17 minutes. Cette opération a été répétée trois fois afin de clarifier le surnageant, qui a ensuite été soigneusement récupéré pour les tests ultérieurs.

- **Étape 2 : Test d'inhibition du SLC brut**

Un test d'inhibition a été réalisé en utilisant le surnageant libre de cellules (SLC) brut, selon la même méthode que celle appliquée pour les cultures pures. Lorsqu'un halo d'inhibition a été observé, une phase de caractérisation du métabolite actif a été engagée.

- **Étape 3 : Identification du métabolite actif**

- Vérification de l'effet de l'acidité (acide lactique)

Le pH du surnageant libre de cellules (SLC) a été ajusté entre 6,5 et 7,0 à l'aide de NaOH stérile (1 N), puis un test de diffusion sur gélose a été répété. La disparition du halo d'inhibition a été interprétée comme un effet inhibiteur attribuable à l'acidité. En revanche, si le halo persistait, la présence d'une autre substance antimicrobienne a été suspectée.

- Vérification de la nature protéique du métabolite (ex. : bactériocine)

Le SLC neutralisé a été traité avec de la caséine à une concentration de 1 mg/ml, puis incubé à 37 °C pendant 1 à 2 heures. Le test d'inhibition a ensuite été répété. La disparition du halo d'inhibition a permis de conclure que le métabolite actif était de nature protéique. En revanche, si l'inhibition persistait, l'implication d'autres types de composés a été supposée.

Contrôles utilisés

• Milieu MRS stérile filtré (contrôle négatif).
• SLC brut (non neutralisé).
• SLC neutralisé sans traitement.
• SLC neutralisé traité à la caséine.

Tableau 13 : résultats de métabolite antimicrobienne

Traitement	Halo d'inhibition	Interprétation
SLC brut	Oui	Présence de métabolite actif
SLC neutralisé	Oui	Test de caséine
SLC neutralisé	Non	Effet dû à l'acidité
SLC neutralisé + caséine	Non	Métabolite de nature protéique

La méthode de détection des métabolites inhibiteurs a été partiellement adaptée en fonction des ressources disponibles au laboratoire. L'étape de traitement par la catalase, généralement utilisée pour vérifier l'implication du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), n'a pas pu être réalisée en raison de l'indisponibilité de l'enzyme au moment des expérimentations.

6. Mesure de la cinétique

6.1. Cinétique de croissance bactérienne par mesure de la densité optique (DO)

Les souches bactériennes étudiées ont été préalablement cultivées dans 10 mL de bouillon MRS, puis incubées à 37 °C pendant 18 heures afin d'obtenir une culture active. Chaque culture a ensuite été standardisée à une densité optique initiale de 0,1 à 600 nm, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant du bouillon MRS stérile comme blanc. L'inoculum ainsi ajusté a été transféré dans un flacon contenant 100 mL de bouillon MRS stérile, puis incubé à 37 °C. L'évolution de la croissance bactérienne a été suivie en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm à des intervalles réguliers de 30 minutes, sur une durée totale de 24 heures. Avant chaque série de mesures, le spectrophotomètre a été systématiquement calibré à zéro avec le milieu MRS non inoculé.

6.2. Dénombrement des cellules viables (UFC)

Le suivi de la viabilité bactérienne a été réalisé par la méthode des dilutions en série. À chaque intervalle d'une heure, un volume de 50 µL de culture a été prélevé, puis transféré dans 450 µL de bouillon MRS stérile pour effectuer les dilutions successives. À partir des trois premières dilutions, un volume de 10 µL a été déposé en spot sur des boîtes de gélose MRS préalablement préparées.Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le comptage des colonies a ensuite été réalisé visuellement, et les résultats exprimés en unités formant colonies par millilitre (UFC/mL), selon la formule suivante :

$$UFC(N) = (\Sigma \text{ colonies} \times 1000 / 30) \times (1 / \text{dilution})$$

7. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- **Méthode 01 :**

La concentration minimale inhibitrice est définie comme la plus faible concentration d'huile essentielle ou d'extrait nécessaire pour inhiber la croissance de 90% de la population microbienne [1,2].La détermination des CMI contre les souches microbiennes est réalisée par la méthode de micro dilution en milieu liquide décrite par Zaoui et al.,(2024). Les surnageants,

considérés comme solutions mères à une concentration de 100 µL/ml, ont été soumis à des dilutions géométriques successives (base 2) dans des plaques de micro titration à 96 puits, avec un volume initial de 100 µL de bouillon Mueller-Hinton dans les puits 1 à 10. Le premier puits a reçu 100 µL de la solution mère, puis des transferts successifs ont été réalisés jusqu'au puits 10, assurant un mélange homogène et des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, etc. Chaque puits contenant 100 µL de dilution a été complété par 90 µL de bouillon Mueller-Hinton et 10 µL d'inoculum bactérienne ajustée à 10^6 UFC/ml, portant le volume final à 200 µL. Le dernier puits de chaque ligne dans la microplaque, qui contenait le bouillon et l'inoculum, a servi de témoin positif, tandis que le 11ème puits serve pour le témoin négatif contentant uniquement de bouillon. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour permettre la croissance bactérienne. La détection de cette croissance a été effectuée par l'ajout de 40 µL d'une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 0,4 mg/ml dans chaque puits, suivi d'une incubation supplémentaire de 30 minutes à 37 °C. La coloration rose résultante a servi d'indicateur de la présence bactérienne et de la viabilité des cultures dans les différentes conditions testées.

- **Méthode 02 :**

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne du surnageant, des dilutions en série ont été préparées dans un milieu BHI ou MH à l'aide de plaques à 96 puits. Les concentrations finales utilisées allaient de 5 % à 90 %, par paliers de 10 %. Chaque puits contenait un volume total de 200 µL, constitué d'un volume précis de surnageant (calculé selon la formule : % souhaité × 200 / 100) complété par le volume nécessaire de milieu BHI ou MH. Par la suite, 10 µL d'une suspension de cultures jeunes de la souche bactérienne cible, à une concentration de 10^6 UFC/ml, ont été ajoutés à chaque puits. Le mélange a été effectué avec précaution afin d'éviter la formation de bulles susceptibles de perturber la lecture de la turbidité. Les plaques ont ensuite été incubées à 30°C pendant 24 heures. La croissance bactérienne a été évaluée visuellement par l'apparition d'une turbidité dans les puits. (Boubakri et al., 2025)

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultat et discussion

III.1.Revivification et confirmation de la pureté des souches pathogènes

III.1.1.Examen macroscopique

Les milieux nutritif, Chapman, Hektoen et Mac konkey et Cétrimide,Gélose GSS , MH et GN ont été utilisés pour la revivification et la confirmation de la pureté des souches pathogènes de référence .L'observation macroscopique des cultures en milieu liquide a révélé la présence d'un trouble homogène(figure16) indiquant une bonne croissance des souches sur milieu solide(figure17),les colonies étudiées possèdent des aspects différents résumés dans le tableau 05



Figure 16 : Aspect macroscopique des isolats sur BN avant et après

Tableau 05 : Observation macroscopique des bactéries pathogènes

Les souches	**Examen macroscopique**					
			Gélose			**Bouillon**
	Dimension	**Forme**	**Couleur**	**Contour**	**Surface**	**Trouble**
Bacillus cereus (GN)	1 < Ø < 3	Ronde à irrégulière	Blanc crème	Bords irréguliers	Lisse à brillante	+
Salmonelle (Hektoen)	0,5 < Ø < 1,5	Ronde	Noire	Bords réguliers	Lisse	+
Staphylococcus aureus(Chapman)	0,5 < Ø < 1	Ronde	Jaune vif	Bords irréguliers	Lisse	+
E coli (MH)	1 < Ø < 2	Ronde	Blanc crème	Bords irréguliers	Brillante	+
Pseudomonas (GN)	1 < Ø < 2	Ronde	Blanc	Bords irréguliers	Mate	+

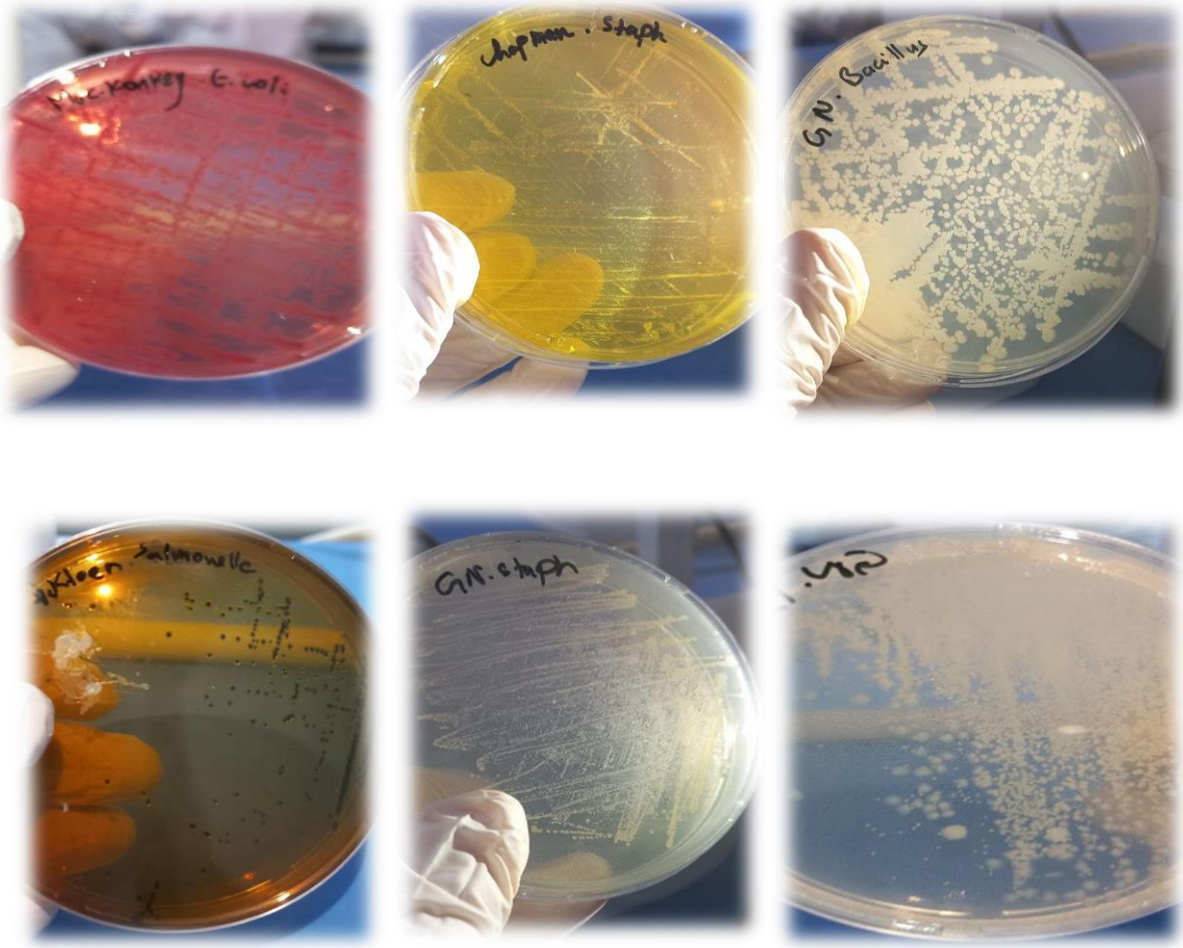
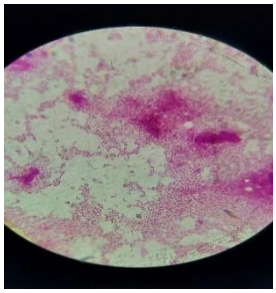
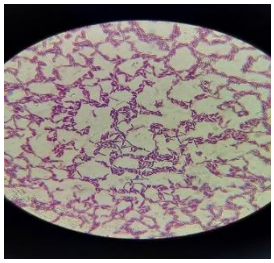
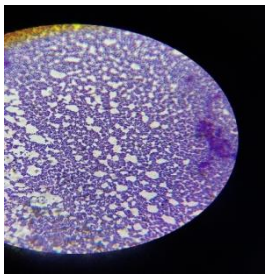
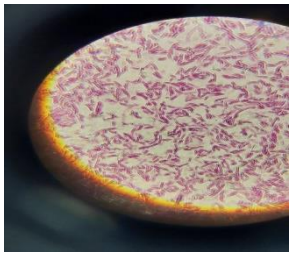


Figure 17 : Aspect macroscopique des souches sur les milieux solides

III.1.2.Examen macroscopique

Pour confirmer la pureté des souches pathogènes de référence revivifiées, une de Coloration de gram a été réalisée . Cette dernière a permis de distinguer entre les bactéries à Gram positif (de couleur violette) et les bactéries à gram négatif (de couleur rose). La forme et Le mode de disposition a été aussi noté : ces bactéries sont sous forme de bâtonnet sou de Coques regroupé différemment (tableau 06)

Tableau 06 : Observation macroscopique (Gram des bactéries pathogènes)

Les souches	Gram	Forme
 *Pseudomonas ssp*	Négatif	Bacilles fins, Légèrement courbés, isolés ou en paires
 *Salmonelles ssp*	Négatif	Bâtonnet regroupés, parfois disposés en amas,coloration rose
 *Bacillus cereus*	Positif	Bâtonne , forme irrégulière
 *Staphylococcus aureus*	Positif	Cocci arrondie sous la forme diplocoque ou sous forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin
 *E coli*	Négatif	Bâtonnet

III.2 .lsolement et identification des bactéries lactiques

III.2.1.Examen macroscopique

L'échantillonnage de 20 échantillons d'intestins des abeilles prélevés à partir de 20 abeilles collectés de différentes régions nous a permis d'obtenir 6 souches, dont (4) isolats de Blida et Médéa (2 isolats) . À ce stade Les isolats ont été purifiés et présumés des bactéries lactiques selon leur caractéristique et leur critère macroscopique , les isolats testés étaient oxydase négatif, catalase négative et gram positif. L'observation macroscopique sur le milieu solide a révélé des colonies circulaires avec une taille variable d'une colonie à l'autre, de couleurs blanchâtres, grisâtres et transparentes elles sont lisses légèrement bombées (figure 18) et sur le milieu liquide l'apparition d'un aspect trouble de milieu.

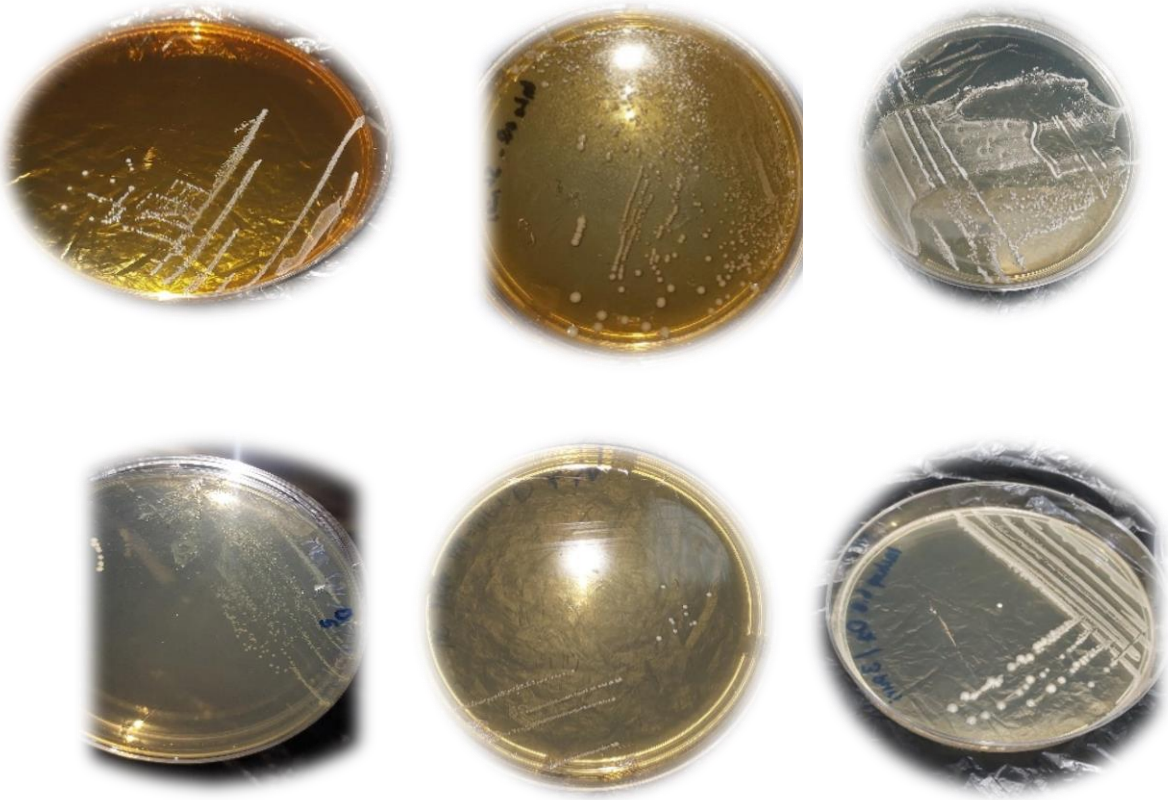


Figure 18 :Aspect macroscopique des isolats sur les différents bouillons

III.2.2. Examen microscopique

L'étude microscopique des bactéries lactiques après la coloration de gram (tableau 07), nous a révélé que les souches sont toutes à gram positif . Ce test nous a permis de Distinguer également la morphologie et le mode de regroupement des bactéries lactiques : les 6 souches (C1- C2C3 et C4 -AB-D -E) sont sous forme de bâtonnets et des cocci, Ces souches ont été disposées en paires, en courtes chaînettes ou isolées .

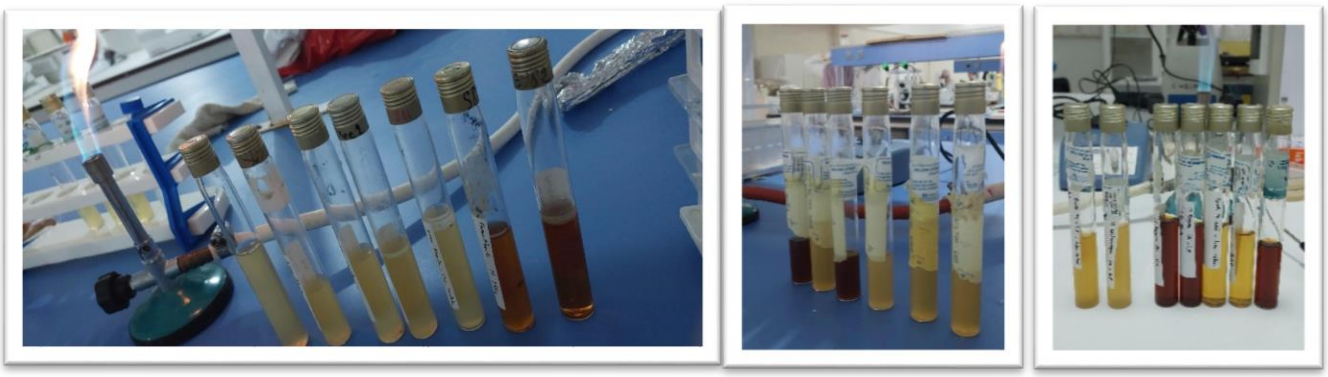
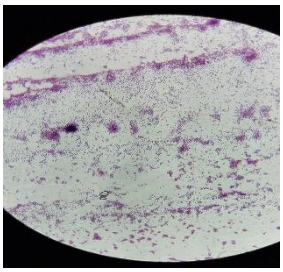
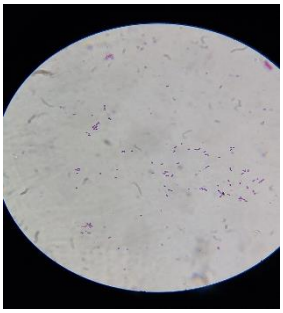
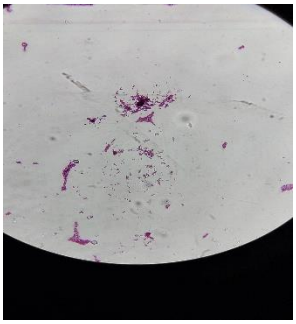
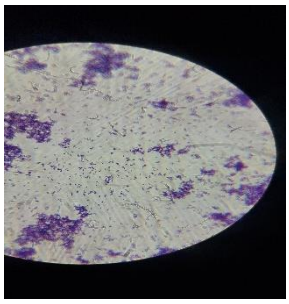
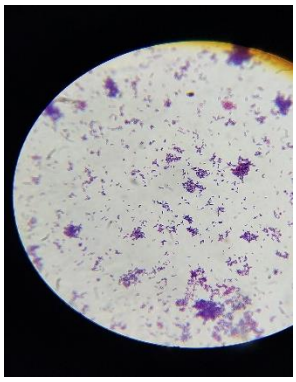


Figure 20 : Aspect macroscopique des isolats sur les différents bouillons.

Tableau 07 : Observation macroscopique (Gram des bactéries Isolé)

Les souches	Gram	Forme
 C1 (Lactococcus)	Positif	Coques en courtes chaînettes ou en amas
 C2C3 (Lactococcus)	Positif	Coques en petites Chaînettes ou amas

 C4 (Lactococcus)	Positif	Coques en Amas irréguliers
 AB (Lactobacillus)	Positif	Bacilles isolés ou en Dipobacilles
 D (Lactobacillus)	Positif	Positif Bacilles isolés ou en dipobacilles
 E (Lactobacillus)	Positif	Bacilles en Courtes chaînettes ou regroupés

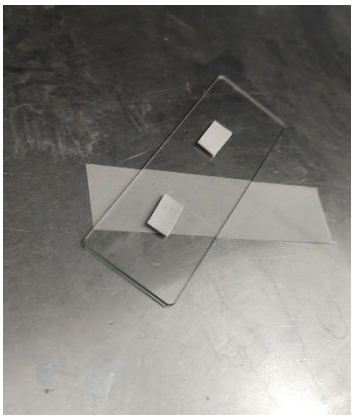
Test catalase

L'ensemble des souches isolées a été soumis au test de catalase afin d'évaluer leur capacité à produire l'enzyme catalase.Les résultats ont révélé une absence totale d'activité catalasique chez toutes les souches analysées, comme en témoigne l'absence de dégagement gazeux après l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_20_2). Ce résultat confirme que les souches sont catalase-négatives, ce qui constitue un critère distinctif des bactéries lactiques figure 21.

Test oxydase

Les souches isolées ont été soumises au Test d'oxydase afin de vérifier la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase. Aucune coloration caractéristique (bleue à violette) N'a été observée après l'application du réactif, ce qui indique une absence d'activité oxydasique chez toutes les souches analysées. Ce résultat est typique des bactéries lactiques, qui ne possèdent généralement pas d'enzymes de la chaîne respiratoire Aérobie comme la cytochrome oxydase. en effet, ces microorganismes sont essentiellement fermentaires et fonctionnent de manière anaérobie ou microaérophile (Hammes & Vogel, 1995). L'absence de cette activité confirme donc l'affiliation présumée des souches étudiées au groupe des bactéries lactiques

Figure 21 : Résultat de test oxydase



III.2.4. Résultats des tests physiologiques et biochimiques :

L'analyse phénotypique a permis de distinguer les isolats mésophiles des thermophiles, les homofermentaires des hétérofermentaires et de sélectionner les souches capables de fermenter divers sucres. Cette identification des isolats nous a facilité l'identification préliminaire des isolats au niveau du genre. Les résultats trouvés sont illustrés dans les tableaux(8,9) et figures . Les isolats sont apparentés aux deux genres suivants : Lactococcus et Lactobacillus.

Parmi les coques lactiques, 3 isolats ont été identifiés. 2 isolats sont présumés du genre Lactococcus présentent un caractère homofermentaire, ADH positif, se développent à 15°C et 37°C et aussi 45°C, pour le pH 4 un seul isolat qui se développer tandis que l'autre non, et les deux sont développer à 4% de NaCl, à pH 9,6 et à 6,5% de NaCl, ils fermentent Glucose Mannitol**,** Inositol**,** Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline et Arabinose. Toutes les souches sont thermorésistantes.

Pour le reste se distingue par ces caractéristiques ont la capacité de poussés à 15°C, 37°C et 45°C, absence de croissance à pH 4 et 9,6 et avec 6,5% de NaCl, et croissance à 4% de NaCl, ADH négative, aussi la souche est thermorésistante. Il ferme de Glucose, Mannitol, Melibiose, Amygdaline et Arabinose et il ne ferme pas de Inositol**,** Sorbitol, Rhamnose, Saccharose.

Parmi la collection des autres isolats, 3 isolats ont été orientés vers le genre Lactobacillus. Ces isolats présentent une certaine différence dans quelques tests. Les 3 genre se distingue par ADH négative, ont l'aptitude à poussés à 15°C, 37°C et aussi dans 45°C, deux souches (AB et D) sont poussées à pH 9 et avec 4% et 6.5% NaCl, mais pas à pH 4 pour la souche AB, ces deux bactéries sont thermorésistantes. Et l'autre souche (E) elle n'a pas la capacité de pousser à pH 9 et 4 avec 4% et 6.5% NaCl. Pour la fermentation des sucres la souche AB n'a pas fermenté de Glucose, Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline, Arabinose. Pour la souche E Il se fermente de Glucose et Arabinose et ne fermente pas de Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose et Amygdaline, Mais pour la souche D elle se fermente toutes les derniers sucres.

Tableau 08 : Caractérisation des tests physiologiques et biochimiques des isolats.

	Groupe 1			**Groupe 2**		
Les isolats identifiés	**AB**	**D**	**E**	**C1**	**C2 et C3**	**C4**
Source	Des abeilles prélevées dans différentes régions des wilayas de Blida et de Médéa (Régions de Guelb Elkebir et Beni Slimane).					
Forme	Bâtonnet			Cocci		
Production de CO2						

Tableau 09: Caractérisation des tests physiologiques

Les isolats	AB	D	E	C1	C2 C3	C4
Hydrolyse de :						
ADH	-	-	-	+	-	+
Citrate	-	-	-	+	+	-
Croissance dans le pH :						
4	-	+	-	+	-	+
9.6	+	+	-	+	-	+
Croissance dans différentes concentrations of NaCl :						
4	+	+	_	-	+	+
6.5	+	+	_	+	-	+
Croissance dans différentes températures :						
37°C	+	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+
Test thermo résistance	+	+	-	+	+	+



Figure22 : Galerie API 20^{E} des isolats

Tableau 10: Résultats du profil fermenter des sucres (microplaques et API20E).

Groupes	Groupe 01 : Lactobacillus			Groupe 02 : Lactococcus		
Les isolats	AB	D	E	C1	C2 C3	C4
Les sucres testés :						
Glucose	-	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+	-	+	+	+
Inositol	-	+	-	+	-	+
Sorbitol	-	+	-	+	-	+
Rhamnose	-	+	-	+	-	+
Saccharose	-	+	-	+	-	+
Melibiose	-	+	-	+	+	+
Amygdaline	-	+	-	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+	+	+

III.2.5.Résultats de la sensibilité aux antibiotiques

Résultats de la sensibilité et la résistance des souches testées aux antibiotiques sont mentionnés dans le tableau 11 et figure 23. Une grande sensibilité des souches a été remarquée envers différent antibiotiques tell qu'Amoxicilline+ Acide clavulanique (30ug), Spiramycine (100ug) et Doxycycline (30ug) Par ailleurs, une résistance a été enregistrée pour toutes les espèces envers Amoxicilline (1g). Tandis que, une résistance a été révélé envers ciprofloxacine (5ug) à l'exception de l'espèce C2 qui a révélée sensible à ce dernier.

Nos résultats sont plus importants à ceux trouvés par Kasimin et al. (2020) qui ont signalé que les souches de *Lactobacillus* isolées des produits laitiers montrent une résistance élevée envers certains antibiotiques comme la ciprofloxacine et la gentamicine. Toutefois, ils sont similaires à eux envers l'amoxicilline et la doxycycline. En outre, les souches étudiées par Bouchibane Malika (2023) ont montré une sensibilité modérée à l'amoxicilline, ce qui est comparable à nos résultats observés pour les souches AB et C4, qui ont présenté des diamètres d'inhibition allant jusqu'à 26 mm pour l'amoxicilline (OX) et la doxycycline (DO).

Les travaux de Zommiti et al. (2022) et Ben Slama et al. (2021) ont également confirmé une forte résistance naturelle des bactéries lactiques à la gentamicine et à la ciprofloxacine, ce qui appuie nos données expérimentales, notamment pour les souches C1, E et D.

Tableau 11: Résultats de la sensibilité aux antibiotiques

	Les souches	**Les antibiotiques**					
		AMC 30ug	**SP 100ug**	**CN 10ug**	**DO 30ug**	**CIP 5ug**	**OX 1g**
Groupe 1	**AB (Lactobacillus)**	**25mm (S)**	**26mm (S)**	**7mm (R)**	**22mm (S)**	**12mm (R)**	**7mm (R)**
	D (Lactobacillus)	**14mm (R)**	**21mm (S)**	**0mm (R)**	**28mm (S)**	**8mm (R)**	**0mm (R)**
	E (Lactobacillus)	**26mm (S)**	**26mm (S)**	**0mm (R)**	**15mm (R)**	**0mm (R)**	**0mm (R)**
Groupe2	**C1 (Lactococcus)**	**9mm (R)**	**0mm (R)**	**15mm (R)**	**12mm (R)**	**24mm (S)**	**0mm (R)**
	C2 C3 (Lactococcus)	**20mm (I)**	**22mm (S)**	**0mm (R)**	**25mm (S)**	**9mm (R)**	**0mm (R)**
	C4 (Lactococcus)	**26mm (S)**	**20mm (I)**	**0mm (R)**	**26mm (S)**	**8mm (R)**	**0mm (R)**

Sensible (S ≥21 mm), intermédiaire (I entre 16-20 mm) et résistance (R≤15 mm). AMC : Amoxicilline+ Acide clavulanique, **CN** : Gentamicine, **SP 100** : spiramycine **CIP:** ciprofloxacines, **OX:** Amoxicilline, **DO:** Doxycycline

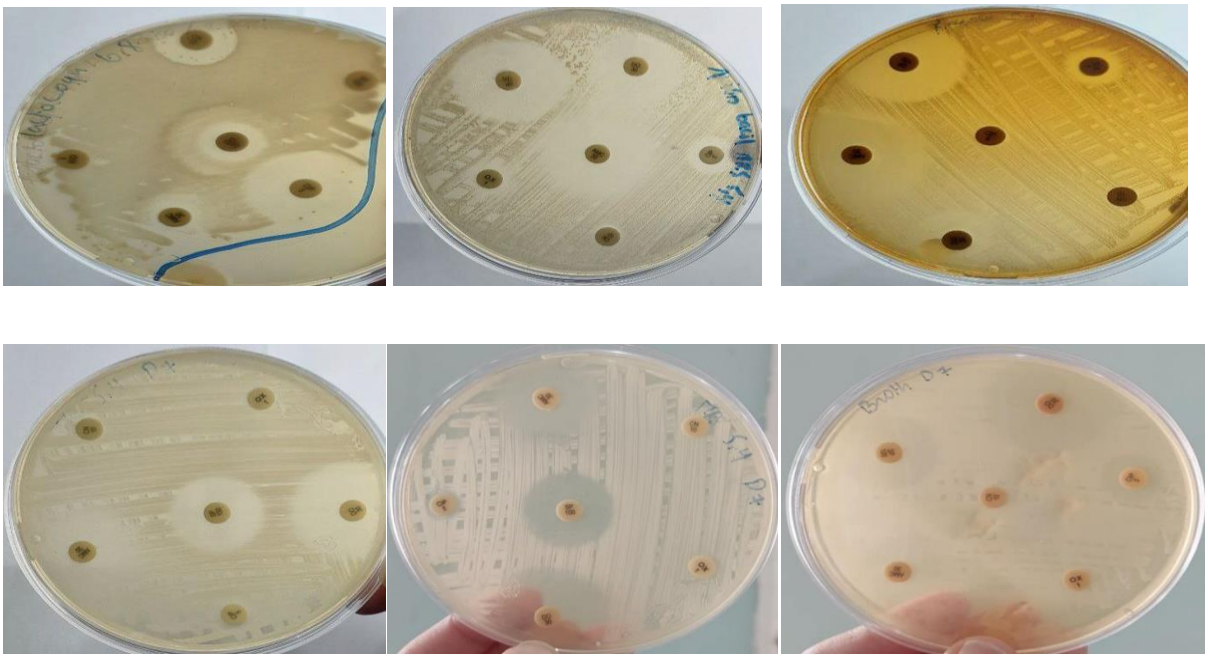


Figure 23: L'antibiogramme des quelques souches testées.

III.2.6.Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques, réalisée à l'aide des méthodes du cylindre sur gélose et des disques, a permis de mettre en évidence des réponses différenciées en fonction des pathogènes ciblés. Ces résultats nous permettent de mieux cerner le potentiel antimicrobien des souches étudiées et de comprendre leur mode d'action vis-à-vis de différentes bactéries pathogènes.

La souche AB s'est révélée particulièrement active contre *Escherichia coli*, avec une zone d'inhibition mesurée à 25,5 ± 0,70 mm (méthode du cylindre). Ce résultat suggère une forte capacité de cette souche à produire des métabolites antimicrobiens, tels que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène ou encore des bactériocines. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Benmechernene et al. (2013) ainsi que Hassanzadazar et al. (2012), qui ont déjà souligné l'effet inhibiteur de certaines souches de Lactobacillus sur E. Coli.

En ce qui concerne Pseudomonas spp., seules les souches AB et D ont montré un effet inhibiteur modéré. Cette résistance partielle peut s'expliquer par la structure complexe de la membrane

externe de ces bactéries, laquelle constitue une barrière naturelle aux substances antimicrobiennes, comme cela a été décrit par Todorov et al. (2011).

Pour *Staphylococcus aureus*, plusieurs souches ont exprimé une activité inhibitrice significative, en particulier la souche C4, qui a atteint un diamètre de 32 mm en utilisant la méthode des disques. Ce résultat met en évidence le potentiel de certaines bactéries lactiques à produire des composés actifs contre les bactéries à Gram positif, ce qui rejoint les observations de Tenea (2017) sur des isolats issus de produits fermentés.

Une activité modérée a également été observée vis-à-vis de *Salmonella spp.*, notamment avec la souche C2, qui a généré une zone d'inhibition atteignant 27 mm. Cette action pourrait être liée à la production d'acides ou de métabolites secondaires ayant un effet inhibiteur. Des études antérieures, telles que celles de Kheadr et al. (2007) et Jamaly et al. (2011), ont également rapporté cette capacité chez certaines souches lactiques, bien que l'effet contre *Salmonella* soit généralement moins marqué que contre les Gram positifs.

En revanche, aucune des souches testées n'a montré d'effet inhibiteur contre Bacillus spp. Cette absence d'activité peut être attribuée à la résistance naturelle de ce genre bactérien, largement documentée dans la littérature, notamment en raison de sa capacité à former des spores (Zouari et al., 2020).

Dans l'ensemble, ces résultats confirment le caractère sélectif des composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques, avec une efficacité plus marquée contre les bactéries Gram positives, en particulier les cocci, ce qui est également appuyé par les travaux de Turgis et al. (2013). Il serait intéressant, dans des travaux futurs, d'approfondir l'analyse des métabolites produits afin d'identifier précisément les composés responsables de cette activité et d'évaluer leur potentiel dans des applications biotechnologiques ou alimentaires.

Tableau12 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des souches lactiques testées vis-à-vis les souches pathogènes (mm) par méthode plugs d'agar.

Souches indicatrices	Souches lactiques					
	D	**C4**	**C2**	**AB**	**E**	**C1**
E. coli	16,5±0,70	0	0	25,5±0,70	0	0
Pseudomonas aeruginosa	11,5±0,70	0	0	15,5±0,70	0	0
Staphylococcus aureus	18,5±0,70	0	11,5±0,70	19,5±0,70	0	0
Salmonella sp	9,0±0,0	0	10,5±0,71	0	0	0
Bacillus cereus	0	0	0	0	0	0
Candida albicans	17.2 ±2,5	0	0	12.5 ±1.5	0	0
Aspergillus brasiliensis	16.5 ±1,5	0	13.5 ±1.5	0	0	0

Tableau13 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des souches lactiques testées vis-à-vis les souches pathogènes (mm) par méthode des disques

Souches indicatrices	Souches lactiques					
	D (mm)	**AB (mm)**	**C2 (mm)**	**C4 (mm)**	**E (mm)**	**C1 (mm)**
E. coli	10 mm	11 mm	15 mm	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus	12 mm	13mm	13 mm	32 mm	0	0
Salmonella spp	10 mm	12 mm	27 mm	0	0	0
Bacillus cereus	0	0	0	0	0	0

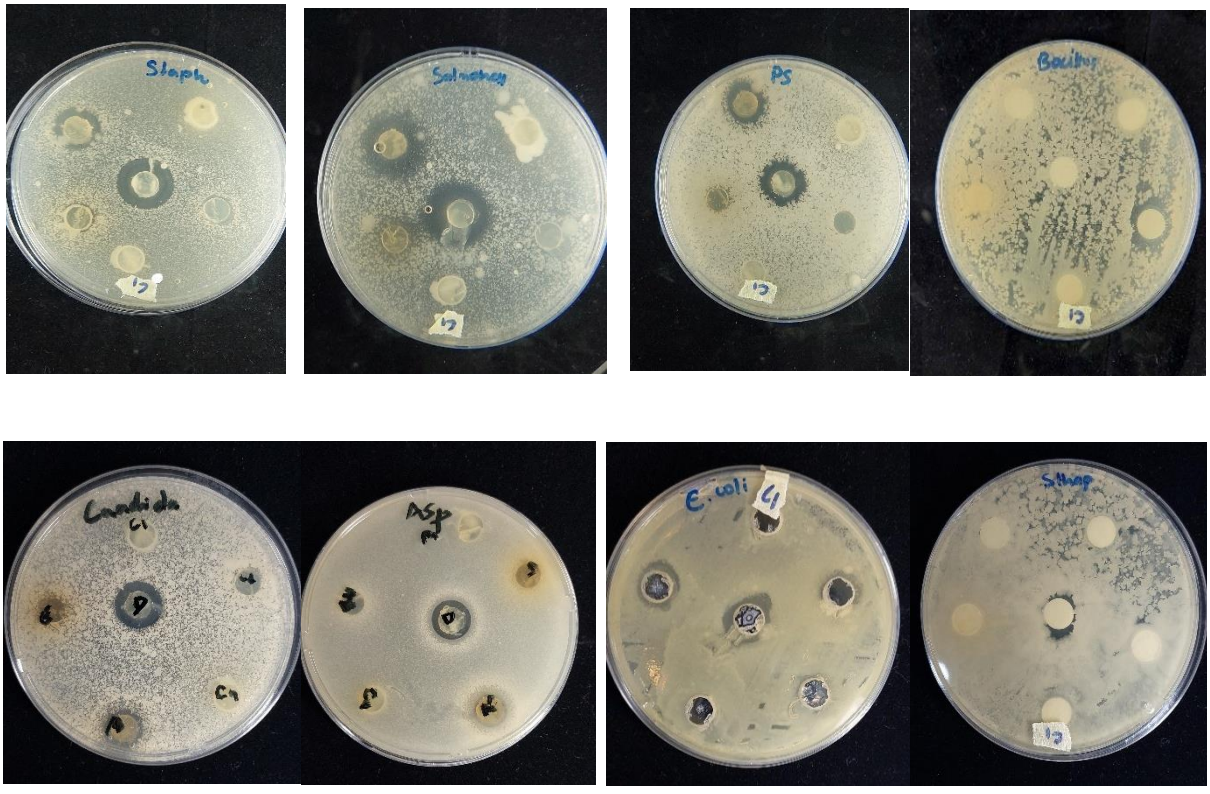


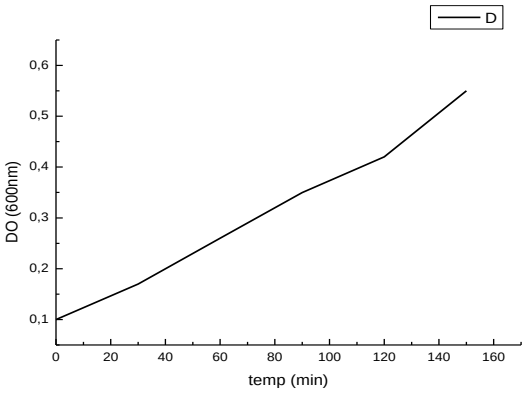
Figure24 : l'activité antimicrobienne des souches lactiques testées vis-à-vis les souches pathogènes

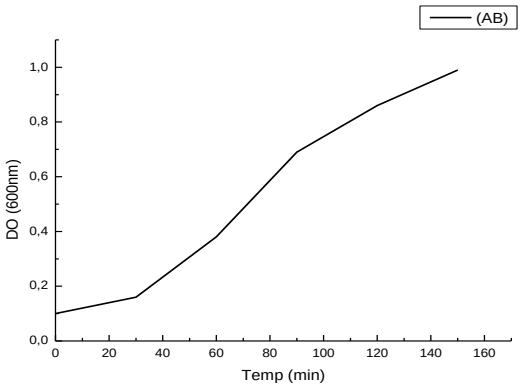
III.2.7.Résultats de la Cinétique de croissance des souches

2.7.1. Cinétique de croissance bactérienne par mesure de la densité optique (DO)

La croissance de nos souches isolées a été déterminée par mesure de la DO et le dénombrement sur gélose, 4 souches ont été suivies pour leur croissance pendant 24h. Les courbes de l'évolution de la densité optique en fonction du temps des 4 souches ont été générées par le logiciel origine. Les résultats sont présentés dans les figures. Sur la base des résultats, la cinétique des souches testées s'est avérée variable d'une espèce à l'autre et même au sein d'une même espèce. Les résultats de la courbe de croissance que nous avons obtenus nous ont permis de distinguer les différentes phases de croissance les courbes de croissance

obtenues pour les souches E, C4, D et AB sont présentées ci-dessous. Sur la base des résultats, la cinétique de croissance varie d'une souche à l'autre. La souche E montre une phase de latence d'environ 30 minutes, suivie d'une phase stationnaire prolongée jusqu'à 100 minutes, avant d'entamer une phase exponentielle entre 100 et 160 minutes, avec des valeurs de DO allant de 0,17 à 0,26. Quant à la souche C4, elle présente une phase de latence de 40 minutes, suivie d'une phase exponentielle rapide entre 40 et 120 minutes, où la DO passe de 0,15 à 0,9, puis une phase stationnaire marquée à partir de 120 minutes. Pour la souche D, la croissance est continue sans phase stationnaire visible, avec une augmentation régulière de la densité optique de 0,1 à 0,55 tout au long de la période d'incubation de 160 minutes. Enfin, la souche AB affiche une phase de latence courte, puis une phase exponentielle continue jusqu'à 160 minutes, atteignant une DO de 0,95. Ces résultats indiquent une diversité cinétique significative entre les différentes souches, suggérant des potentiels variés dans les processus de fermentation.





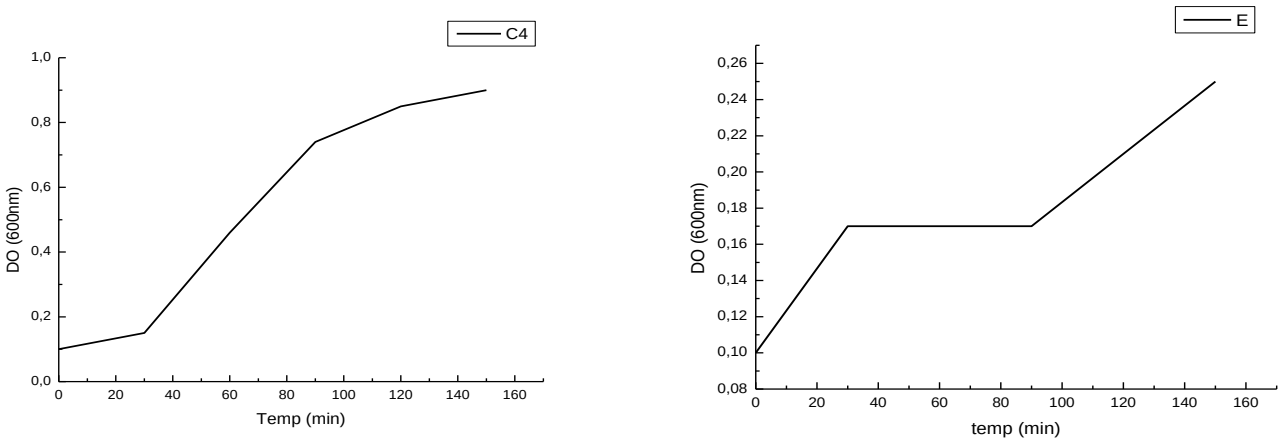


Figure 25 : des courbes de la CMI (Concentration minimale hinibitrice)des bacteries lactiques (AB , D,E,C4)

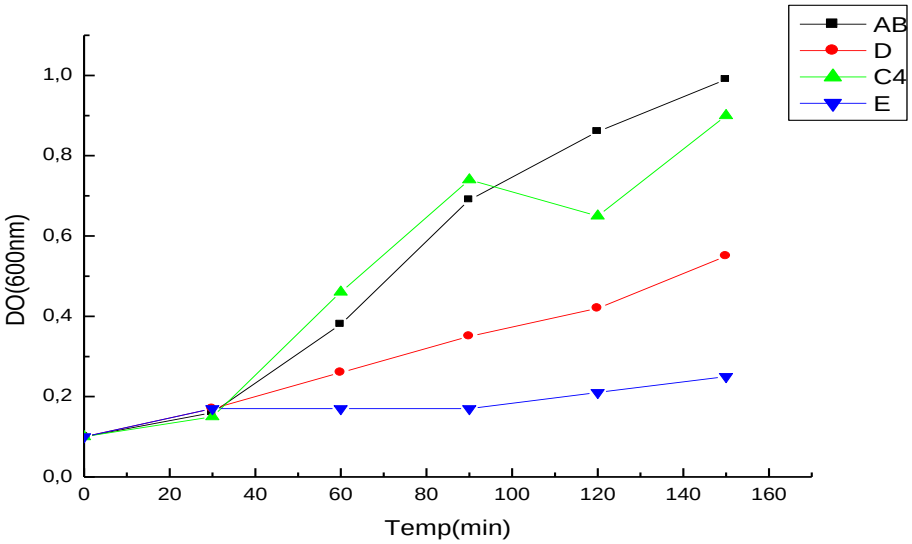


Figure26 : un courbe comparative de la CMI (Concentration minimale hinibitrice)des bacteries lactiques (AB , D,E,C4)

2.7.2. Dénombrement des cellules viables (UFC)

Dans le but d'évaluer le potentiel de croissance des souches isolées, une étude cinétique a été menée sur une période d'incubation de trois heures. Les données recueillies ont été analysées à l'aide de Python 3.11, en s'appuyant sur les bibliothèques Pandas pour le traitement des données et Matplotlib pour la visualisation graphique. Ce protocole a permis de suivre précisément l'évolution du nombre d'unités formant colonie (UFC) pour chaque souche (Figure 27).

Les résultats ont révélé des profils de croissance distincts. Les souches C4 (Lactococcus) et D (Lactobacillus) ont rapidement atteint leur phase stationnaire, dès la deuxième heure, avec une densité d'environ 290 UFC. Ce comportement traduit une adaptation rapide aux conditions du milieu et une cinétique de croissance élevée. À l'inverse, la souche AB (Lactobacillus) a présenté une phase exponentielle plus étalée, atteignant légèrement plus de 290 UFC au terme des trois heures. Ce profil suggère une croissance plus modérée, mais stable, qui pourrait refléter un compromis entre vitesse de prolifération et robustesse métabolique. La souche E (Lactobacillus) s'est démarquée par une croissance continue et soutenue, atteignant une densité finale de 360 UFC, ce qui témoigne d'une activité prolongée dans le temps.

Ces observations rejoignent les tendances décrites dans la littérature. En effet, les Lactococcus sont souvent associés à une croissance rapide en milieux riches (Delavenne et al., 2021), tandis que les Lactobacillus sont reconnus pour leur stabilité métabolique même à vitesse réduite (Alves et al., 2020). Le comportement intermédiaire de la souche AB pourrait correspondre à une stratégie d'équilibre, comme celle décrite par Ben Amor et al. (2023), mettant en avant des paramètres cinétiques tels que le taux de croissance spécifique (μmax), le temps de doublement (Td) et la durée de la phase de latence (λ).

En somme, la diversité des dynamiques de croissance observées constitue un critère essentiel dans l'orientation vers des applications biotechnologiques ciblées. Les souches à croissance rapide, comme C4 et D, semblent adaptées à des procédés de fermentation courte, tandis que les profils plus stables, comme ceux de AB et E, offrent un intérêt particulier pour des formulations à action prolongée, notamment dans le domaine des probiotiques.

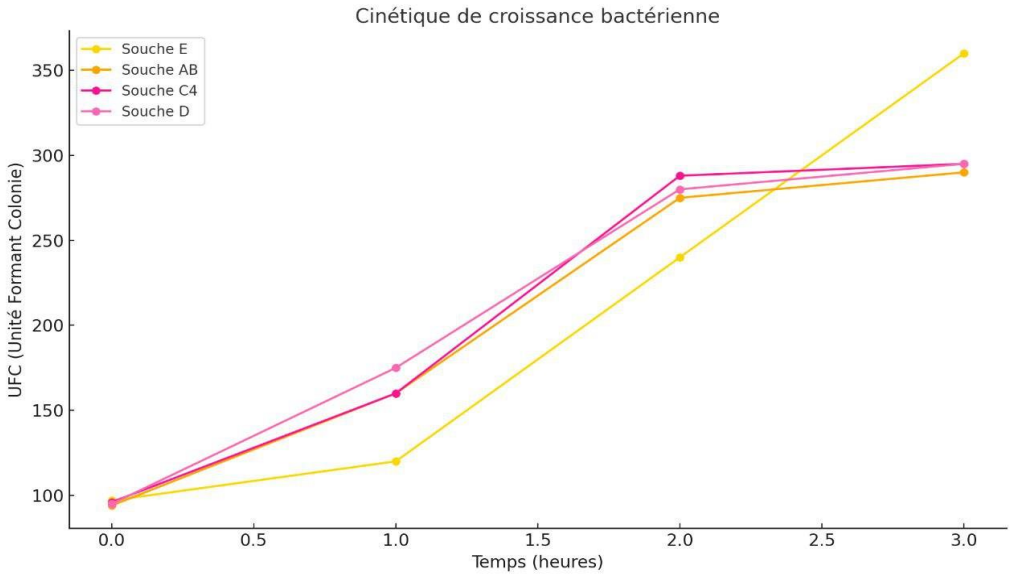


Figure 27 : un courbe comparatif de la CMI (par UFC) des bactéries lactiques (AB, D, E, C4)



Figure28 : Denomebrement des bactires lactiques

III.2.8.Metabolite antimicrobienne

Les tests de caractérisation du métabolite actif présents dans le surnageant des cultures lactiques (SLC) ont permis d'identifier la nature des composés responsables de l'effet inhibiteur observé contre différentes souches indicatrices. L'inhibition du développement de *E. Coli, Salmonella et Candida albicans* par certaines souches lactiques a été confirmée en présence du SLC brut. Cependant, la neutralisation du pH a entraîné la disparition de l'activité inhibitrice dans plusieurs cas, suggérant que l'effet était principalement dû à l'acidité, notamment à l'acide lactique.

C'est notamment le cas de la souche Lactobacillus D qui a montré une activité inhibitrice contre E. Coli et Candida, uniquement avec le SLC brut, perdue après neutralisation, ce qui indique que l'effet antimicrobien est attribuable à l'acidité (De Keersmaecker et al., 2006). De manière similaire, l'effet inhibiteur de la souche Lactobacillus D contre *Salmonella* a également disparu après neutralisation, confirmant cette hypothèse.

En revanche, les souches Lactobacillus AB ont maintenu une activité antibactérienne après neutralisation du SLC, mais cette activité a disparu suite à l'ajout de caséine. Cela révèle que le métabolite actif est de nature protéique, probablement une bactériocine. Ce type de composé est bien connu chez les Lactobacillus, notamment chez L. Plantarum, qui produit des bactériocines actives contre les bactéries Gram-négatives (Todorov & Dicks, 2005). L'implication de telles substances protéiques dans notre étude suggère un potentiel probiotique intéressant, en particulier contre *Salmonella* et *Candida*

La souche Lactococcus C2 a montré une inhibition de *Candida* uniquement via le SLC brut, ce qui traduit une activité acidifiante, mais sans indication d'une action protéique. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Strus et al. (2005), qui ont mis en évidence une activité antifongique des lactobacilles due principalement à la production d'acide lactique et à la compétition pour les nutriments.

Enfin, il est important de noter que l'étape de traitement par la catalase pour tester l'implication du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) n'a pas pu être réalisée, limitant l'interprétation complète du spectre antimicrobien. Dans l'ensemble, ces résultats confirment la capacité des souches lactiques, notamment Lactobacillus AB, à produire des composés antimicrobiens variés (acides organiques et protéines antimicrobiennes), ce qui renforce leur potentiel d'application en tant qu'agents bioprotecteurs ou probiotiques dans le domaine alimentaire ou médical.

Tableau14: Resultat des metabolite antimicrobienne

Les souches indicatrices	Traitement			Les souches lactiques	Interprétation
	SLC brut	SLC neutralisé	SLC neutralisé +caséine		
E . coli	Oui	Non	Non	D	Effet dû à l'acidité
	Oui	Oui	Non	AB	Métabolite de nature protéique
Salmonella spp	Oui	Non	Non	D	Effet dû à l'acidité
	Oui	Oui	Non	AB	Métabolite de nature protéique
C. albicans	Oui	Non	Non	C2	Effet dû à l'acidité
	Oui	Non	Non	D	Effet dû à l'acidité

III.2.9.Concentration minimale inhibitrice CMI

Méthode 01 :

Les données montrent que toutes les souches lactiques testées ont manifesté un effet inhibiteur contre au moins une souche pathogène.
La souche C2 s'est distinguée particulièrement par une activité très forte contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 60 %), ce qui indique la probable présence de composés antimicrobiens puissants, notamment des bactériocines.

Les bactéries lactiques sont reconnues pour leur aptitude à produire divers métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (lactique, acétique), le peroxyde d'hydrogène, ainsi que les bactériocines. Ces composés peuvent inhiber une large gamme de micro-organismes pathogènes.

- Inhibition de *Staphylococcus aureus* : La forte sensibilité de cette souche vis-à-vis des surnageants, notamment avec la souche C2, est cohérente avec les travaux de Dobson et al. (2012) qui ont démontré une inhibition marquée de S. aureus par des souches productrices de plantaricines.

- Effet sur les bactéries Gram-négatives *(E. coli, Salmonella)* : Ces bactéries sont connues pour être plus résistantes aux agents antimicrobiens en raison de leur membrane externe. Toutefois,

les souches lactiques testées ont montré une inhibition efficace, ce qui rejoint les observations de Silva et al. (2018).

- Inhibition de Pseudomonas spp. : Pathogène opportuniste souvent multirésistant, il a été inhibé à des concentrations modérées (30 % à 20 %), ce qui peut s'expliquer par l'action combinée d'acides organiques e-Inhibitioances tensioactives (Valdés-Varela et al., 2016).

- Activité antifongique contre *Candida* : Les trois souches lactiques (D, AB, C2) ont montré une inhibition similaire de Candida spp (CMI = 30 %), ce qui laisse penser à une production commune de composés antifongiques comme les acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène Ce résultat rejoint les travaux de Pascua et al. (1999), qui ont observé une inhibition de *Candida* albicans par certaines souches de Lactobacillus, probablement liée à l'acidification du milieu.

- Effet sur Bacillus : Une inhibition modérée a été notée (20 % à 30 %), reflétant une certaine sensibilité aux composés lactiques.

Tableau15 : Represente la Concentration minimale inhibitrice CMI (methode2)

Souches lactiques	*Salmonella spp*	*E. coli*	*B.cereus*	*S. aureus*	Pseudomonas spp	*C.albicans*
D	40 %	40 %	30 %	40 %	30 %	30 %
AB	30 %	20%	20 %	30 %	20 %	30 %
C2	30 %	30 %	30 %	60 %	30 %	30 %

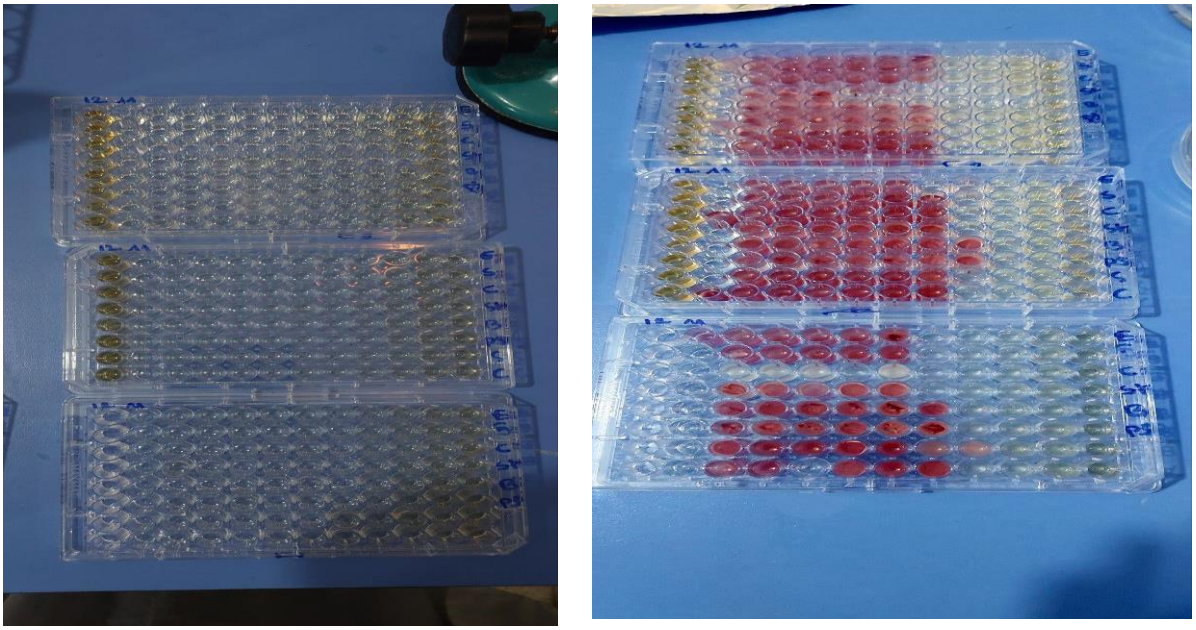


Figure 29: Represente la Concentration minimale inhibitrice CMI (methode1)

Méthode 02 :

La souche D est distinguée particulièrement par une activité très forte contre *S.aureus*, *Salmonella spp*, *B.cereus*, *E. coli*, *C. albicans* et *Pseudomonas spp*, ce qui indique la probable présence de composés antimicrobiens puissants, notamment effet dû à l'acidité.

Les résultats obtenus montrent que la souche lactique D possède une activité antimicrobienne notable, notamment contre *Salmonella spp* et *Pseudomonas spp*, avec une inhibition respective de 60 % et 80 % à pH neutre (pH 7). En revanche, lorsque le pH est maintenu à son niveau d'origine — probablement acide — l'activité antimicrobienne est encore plus marquée, ne présentant aucun trouble dans l'inhibition de toutes les souches pathogènes testées.

Ces résultats suggèrent que l'activité antimicrobienne de la souche D est en grande partie attribuable à la production d'acides organiques (comme l'acide lactique ou acétique), lesquels abaissent le pH du milieu et créent un environnement défavorable à la croissance de nombreux pathogènes. Ce constat est en accord avec les observations de Gänzle (2015), qui indique que les bactéries lactiques exercent leur pouvoir inhibiteur principalement via la production d'acide lactique et d'autres composés antimicrobiens comme les bactériocines. D'autres études, comme celle de Dobson et al. (2012), ont aussi montré une sensibilité marquée de Salmonella et de Pseudomonas aux métabolites produits par les LAB (Lactic Acid Bacteria), particulièrement à bas pH. Par ailleurs, l'efficacité contre des souches aussi diverses que *S. aureus*, *E. coli* et *C.*

albicans renforce l'hypothèse d'un spectre d'activité large, ce qui pourrait faire de la souche D'une candidate potentielle pour des applications bioconservatrices dans l'agroalimentaire, comme le souligne l'étude de Ahmadova et al. (2013). Enfin, le fait que l'activité diminue de manière significative à pH neutre confirme l'importance du facteur acide, bien qu'il soit également possible que d'autres composés comme les bactériocines ou les peroxydes jouent un rôle complémentaire.

Tableau18: Represente la Concentration minimale inhibitrice CMI (methode2)

Les souches lactique	***Salmonelle spp***	***Pseudomonas spp***
D Ph =7	60%	80%
D	Aucune trouble avec toutes les bacteries	

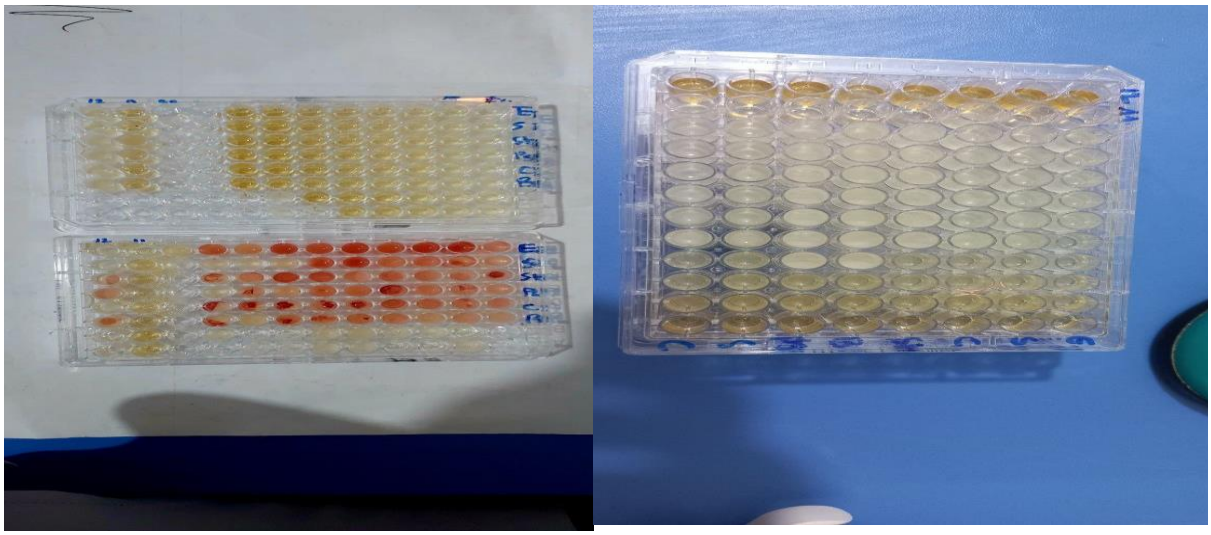


Figure23 : Represente la Concentration minimale inhibitrice CMI (methode2)

CONCLUSION

Conclusion

En Algérie, la valorisation des ressources microbiologiques locales représente une orientation stratégique pour le développement de solutions biotechnologiques durables. C'est dans cette optique que la présente étude s'est focalisée sur l'isolement et la caractérisation de bactéries lactiques (LAB) à partir du microbiote intestinal d'abeilles locales, dans le but d'évaluer leur potentiel antimicrobien à travers la production de métabolites bioactifs.

Dans un contexte mondial marqué par la montée alarmante des résistances antimicrobiennes, l'exploration de niches écologiques alternatives, comme l'intestin des abeilles, s'avère être une voie prometteuse pour la découverte de microorganismes d'intérêt thérapeutique et alimentaire. Cette étude s'inscrit pleinement dans cette démarche innovante, en adoptant une approche rigoureuse combinant l'isolement, l'identification phénotypique et biochimique, ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne des souches obtenues.

L'analyse a permis d'isoler six souches distinctes, parmi lesquelles quatre codées (AB, D, E et C4) appartenant au genre Lactobacilli et Lactococcus ont montré une activité antimicrobienne notable à l'égard de plusieurs pathogènes de référence, notamment *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella spp., Candida albicans*ATCC10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 . Les tests réalisés par les méthodes des disques, des puits et des agar plugs ont mis en évidence des zones d'inhibition dépassant 20 mm, témoignant de l'efficacité biologique des métabolites produits.

L'étude des surnageants de culture a permis de distinguer un mécanisme d'action de l'effet acidifiant, particulièrement observé chez la souche D, lié à la production d'acides organiques (lactique, acétique), entraînant une acidification du milieu défavorable à la prolifération des pathogènes. Ces observations ont été renforcées par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI). Au-delà de leur activité antimicrobienne, les souches isolées se sont révélées résistantes à divers stress environnementaux, notamment les variations de température, de pH et de salinité (NaCl). Elles ont aussi présenté une tolérance modérée à certains antibiotiques, renforçant leur potentiel d'application en tant qu'agents biotechnologiques dans les domaines de la santé et de la conservation alimentaire .L'originalité de cette étude

CONCLUSION .

repose sur l'exploitation d'un écosystème rarement exploré : le microbiote intestinal des abeilles. Ce dernier s'est avéré être un réservoir de bactéries lactiques bioactives capables de remplacer certains agents conservateurs chimiques et de répondre aux enjeux actuels de sécurité sanitaire. Les résultats obtenus ouvrent la voie à plusieurs axes de recherche prometteurs :

- Approfondir la caractérisation moléculaire des souches, notamment l'identification des gènes codant pour les bactériocines afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.
- Réaliser des études in vivo pour évaluer la stabilité, l'innocuité et l'efficacité des souches dans des conditions biologiques réelles.
- Tester leur potentiel de bioconservation dans différentes matrices alimentaires (jus, viandes, produits végétaux).
- Explorer leurs propriétés fonctionnelles supplémentaires, telles que les effets antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux.

RÉFÉRENCE

Référence

A. BADIS, N. LAOUABDIA-SELLAMI, D. GUETARNI, M. KIHAL, R. OUZROUT,2005, CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DE DEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES "ARABIA ET KABYLE". .

A. Mofredj H. Bahloul C. Chanut 2007 Review article Lactococcus lactis: un pathogène opportuniste? Lactococcus lactis: an opportunistic bacterium? Author links open overlay pane 37-4.

Abekhti, A. 2015. Évaluation et valorisation du procédé traditionnel de conservation des dattes «Btana » et détermination de leur biodiversité microbienne. Thèse de Doctorat Université Oran1. .

Adelene Ai-Lian Song1*, Lionel L. A. In2, Swee Hua Erin Lim3 and Raha Abdul Rahim 2017 A review on Lactococcus lactis: from food to factory.

Agnès Fayet,2015, Morphologie & anatomie de l'abeille 33p.

Ahmadova, A. , Todorov, S. D. , Hadji-Sfaxi, I. , Choiset, Y. , Rabesona, H. , Messaoudi, S. ,. . . & Chobert, J. M. (2013). Antimicrobial and antifungal activities of Lactobacillus curvatus strains isolated from homemade fermented milk. Annals of Microbiology, 63, 1347–1355.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, von Wright & Ouwehand (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. CRC Press.

Badis A. , Laouabdia-Sellami N. , Guetarni D. , Kihall M. et 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 et Technologie n°: 23, pp 30-37. .

Baudon, B. (2019). La différenciation des abeilles en reines et ouvrières: une question d'épigénétique. .

Benmechernene, Z. et al. (2013). Antibacterial activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from Algerian traditional food. African Journal of Microbiology Research, 7(20), 2112–2119. .

Bio-Rad. (2011). Conservation des souches bactériennes (Version 3, 20/05/11). Bio-Rad Laboratories. .

REFERENCE .

BOUCHIBANE, M. (2023). Identification des bactéries lactiques isolées des produits laitiers artisanaux: Aptitudes technologiques et essais de fabrication d'un lait fermenté. [Thès de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem].

Boubakri, K.., Idoui, T., Aristimuño Ficoseco, M. C.,Segli, F., Castellano, P., Saavedra, L., & Vignolo, G.(2025). Autochthonous lactic acid bacteria from Kaddid as functional starter culture to improve quality and safety. Discover Food, 5(1), 113.

Bruno Pot, Giovanna E Felis, Katrien De Bruyne, Effie Tsakalidou, Konstantinos Papadimitriou, Jørgen Leisner, Peter Vandamme 2014 Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy, 249-353.

Carine Dortu, Philippe Thonart,2009, Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.

Carr F. J. , Chill D. , Maida N. (2002). <<< The Lactic Acid Bacteria: A Littérature Survey >>>. critical Rev. Microbiol. 28: 281-370. .

Corrieu, G. & Luquet, F. M. (2008). Bactéries lactiques: De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Docp. 849. .

De Keersmaecker, S. C. J. , Verhoeven, T. L. A. , Desair, J. , Marchal, K. , Vanderleyden, J. , & Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. FEMS Microbiology Letters, 259(1), 89–96. .

Delgado, S. et al. (2007). Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products and their inhibitory activity against foodborne pathogens. Food Microbiology, 24(6), 535-541.

Dheeraj MOHANIA, Ravinder NAGPAL,' Manoj KUMAR, Aarti BHARDWAJ, Mukesh YADAV, Shalini JAIN,1 Francesco MAROTTA, Vinod SINGH,Om PARKASH Hariom YADAVSS,2004, Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria 9, 190-198.

Dobson, A. , Cotter, P. D. , Ross, R. P. , & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? Applied and Environmental Microbiology, 78(1), 1–6. .

Elisa Salvetti · Sandra Torriani · Giovanna E. Felis 2012 The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update.

Frank J. Carr, Don Chill, and Nino Maida,2002, The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey Critical Reviews in Microbiology, 28(4): 281-370.

REFERENCE .

Gilles A. , (2010), La biologie de l'abeille. Ecole d'apiculture sud- Luxembourg. 26 p. .

Gálvez, A. , Abriouel, H. , López, R. L. , & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 120(1-2), 51–70. .

Gänzle, M. G. (2015) Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage Current Opinion in Food Science.

Hassaine, (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de laits camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'Oran. P20-33.

Hassanzadazar, H. et al. (2012). Antimicrobial activity of Lactobacillus strains isolated from traditional dairy products. Journal of Food Safety, 32(3), 409–413. .

Holzapfel, W. H. , Haberer, P. , Geisen, R. , Björkroth, J. , &Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal.

Hugenholtz J. & Kleerebezem M. , 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. Curr. Opin. Biotechnol. , 10(5), 492-497. .

Idoui, T. , Boudjerda, J. , Leghouchi, E. , & Karam, N. E. (2009). Lactic acid bacteria from 'Sheep's Dhan', a traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. Grasas y Aceites, 60(2), 177-183. .

Izquierdo Alegre, E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de Vactivité Probiotique (Thèse de doctorat, université Strasbourg). .

J. Ennadir, R. Hassikou, G. Al Askari, M. Arahou, F. Bouazza, LIAmallah, S. A. amine, K. Khedid, 2014, Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco) 5 (4) 1125-1132.

Jamaly, N. et al. (2011). Probiotic potential of LAB from Moroccan traditional product. African Journal of Biotechnology, 10(79), 18209–18215. .

Jomaa Alomar 2007 thèse Étude de propriétés physiologiques de Lactococcus lactis et de Lactococcus garvieae pour la maîtrise de Staphylococcus aureus en technologie fromagère.

REFERENCE .

Katie Fisher, Carol Phillip, 2009 The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus Microbiology 155 (6), 1749-1757.

Kheadr, E. et al. (2007). Survival of bifidobacteria exposed to bile salts and low pH. International Dairy Journal, 17(6), 615–622. .

Laure cailloce, 2016, pourquoi les abeilles disparaissent.

M Teuber, 1995 The genera of lactic acid bacteria, 173-234.

María Alejandra Parreño, C Alaux,et J-L Brunet, Louella Buydens, Michał Filipiak, Mickael Henry, A Keller, A-M Klein, M Kuhlmann, Céline Leroy, Ivan Meeus, E Palmer-Young, Niels Piot, Fabrice Requier, F Ruedenauer, Guy Smagghe, PC Stevenson, SD Leonhardt 2022. Critical links between biodiversity and health in wild bee conservation. 23-114].

MATAMOROS S. , 2008. Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Nantes. Syst Bacteriol. .

Michel Desmazeaud,1996, Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité 5: 331-43.

Michel Girdwoyn,1876,livre anatomie et physiologie de l' abeille.

Mulaw, G. , Sisay Tessema, T. , Muleta, D. , and Tesfaye, A. (2019). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. International Journal of Microbiology, 2019, 7179514 of clinical nutrition, 73(2), 365s-373s.

Mónica García-Solache, Louis B Rice, 2019 The Enterococcus: a model of adaptability to its environment Clinical microbiology reviews 32 (2), 10. 1128/cmr. 00058-18.

Ouwehand, A. C. , Salminen, S. , & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek, 82(1), 279–289. .

P. Tailliez, 2004 Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine Lactobacilli: properties, habitats, physiological role and importancein human health 1-6, 35-41.

REFERENCE .

Parvez, S. , Malik, K. A. , Kang, S. A. , & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100(6), 1171–1185. .

Pierre Renault, 2008 génétiques des bactéries lactiques livre des bactéries lactiques de luquet et Corrieu v-1,153-172.

Pradhan, D. , Paudel, D. , Thapa, S. , & Shrestha, S. (2023). In vitro screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented foods for potential probiotic properties. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 13, 1127256. .

Radhika, S. , Selvaraj, B. , Radhakrishnan, M. , & Balagurunathan, R. (2011). Bioprospecting of fresh water Actinobacteria: Isolation, characterization And antagonistic potential of selected Actinobacteria. Journal of Pharmacy Research, 4(8), 2584-2586.

RASOLOFOARIVAO Henriette,2014, Apis mellifera unicolor (Latreille, 1804, Hymenoptera: Apidae) et Varrroa destructor (Anderson and Trueman, 2000, Acari: Varroidae) à Madagascar: diversité génétique, impact et comportement hygiénique (these de doctorat).

Samelis, J. , Maurogenakis, F. ,& Metaxopoulos, J. (1994). Characterisation of LActic acid bacteria isolated from naturally Fermented Greek dry salami. International Journal ofFood Microbiology, 23(2), 179-190. .

Sanders, M. E. , Merenstein, D. J. , Reid, G. , Gibson, G. R. , & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 16(10), 605–616. .

Shehata, M. G. , El Sohaimy, S. A. , El-Sahn, M. A. , et Youssef, M. M. (2016). Screening of Isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt Hydrolase activity. Annals of Agricultural Sciences, 61(1), 65-75. .

Simon Lévesque, Yves Longtin, Marc-Christian Domingo, Cynthia Massé,Harold Bernatchez, Christiane Gaudreau, Cécile Tremblay,2016, Enterococcus pallens as a potential novel human pathogen: three cases of spontaneous bacterial peritonitis.

SPÜRGIN, A. (2010). Guide de l'abeille. delachaux et niestlé. .

Stiles M. E. & Holzapfel W. , 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. , 36(1), 1-29. .

REFERENCE .

Strus, M. , Pakosz, K. , Gosciniak, H. , Przondo-Mordarska, A. , Rozynek, E. , & Heczko, P. B. (2005). Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against Candida in the context of probiotics. Polish Journal of Microbiology, 54(4), 311–317. .

Tailliez Patrick, 2001. Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Lait. , 81: 1-11.

Tenea, G. N. (2017). Antimicrobial activity of Lactobacillus strains isolated from Ecuadorian fruits. Brazilian Journal of Microbiology, 48(4), 756–766. .

Todorov, S. D. et al. (2011). Bacteriocins of lactic acid bacteria and their potential for the preservation of meat and meat products. Meat Science, 89(4), 444–454. .

Todorov, S. D. , & Dicks, L. M. T. (2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 36(2–3), 318–326. .

Turgis, M. et al. (2013). Antimicrobial properties of natural extracts in food applications. Food Control, 30(2), 686–691. .

Van Alphen, J. (2024). Le destin des faux bourdons: subir une concurrence implacable au profit de l’adaptation de la population. .

Vinderola, G. , O’Rourke, P. , & Fox, J. (2010). Test à l’oxydase pour l’identification des Bactéries. Journal of Microbiological Methods, 82(1), 98-101. .

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

Wallace, T. D. , Bradley, S. , Buckley, N. D. & Green-Jonhson, J. H. (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. Journal of Food Protection 2003. Vol. 66 (3): 466-472.

William SEYFARTH, 2010 L'élevage de Faux-bourdons (livre) 24 pages.

Yang, E. , Fan, L. , Jiang, Y. , Doucette, C. , & Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing Lactobacillus plantarum isolated from Chinese fermented food. Food Control, 27(1), 338–342. .

REFERENCE .

YAOA. A. , EGOUNLETY M. , KOUAME L. P. , THONART P. 1,2009, Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. .

Zouari, R. et al. (2020). Lactic acid bacteria from fermented olives and their antibacterial effect on Bacillus cereus. LWT - Food Science and Technology, 117, 108650.

ANNEXES

ANNEXES:

Les milieux de cultures

- Gélose nutritif (GN) :

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g

- Eau distillée 1000 ml

- Müller-Hinton (MH)

Peptone	17g
Extrait de viande	2g
Amidon	1.5g

- Agar 17g

Eau distillée 1000ml

- Bouillon nutritive (BN)

Peptone	5g
Extrait de viande	3g

- Chlorure de sodium 5g
- Eau distillée 1000ml

- Milieu Chapman

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g

- Eau distillée 1000ml

- King A

Peptone : 20,0 g

K_2HPO_4 (diphosphate de potassium) : 1,5 g

MgSO_4 · 7H_2O (sulfate de magnésium heptahydraté) : 1,5 g

Glycérol : 10,0 ml

Agar : 15,0 g
Eau distillée 1000ml

- Cétrimide

Peptone de gélatine 20 g
Chlorure de magnésium 1,4 g
Sulfate de potassium 10 g
Cetrimide (bromure de cétyltriméthylammonium) 0,3 g
Glycérol : 10 ml
Agar : 13,6 g
Eau distillée 1000ml

- MacConkey

Peptone : 17 g
Peptone de soja : 3 g
Lactose : 10 g
Biles : 1,5 g
Chlorure de sodium : 5 g
Rouge neutre (indicateur de pH) : 0,03 g
Cristal violet : 0,001 g
Agar : 15 g
Eau distillée 1000ml

- Milieu MRS (PH=5.4)

Peptone 10 g
Extrait de viande 8g
Extrait de levure 5g
Acétate de sodium 5g
Phosphate dipotassique 2g
Citrate d'ammonium 2g
Sulfate de magnésium 0.1g
Sulfate de manganèse 0.05g
Glucose 20g
Tween 80 1g
Agar 15g
Eau distillée 1000ml

- Eau physiologique

Chlorure de sodium 9g
Eau distillée 1000ml

- Bouillon MRS (PH=5.4)

Peptone 10 g
Extrait de viande 8g
Extrait de levure 5g
Acétate de sodium 5g
Phosphate dipotassique 2g
Citrate d'ammonium 2g
Sulfate de magnésium 0.1g

Sulfate de manganèse 0.05g
Glucose 20g
Tween 80 1g
Eau distillée 1000ml

- Rogosa (PH=5.8)

Peptone 20 g
Extrait de levure 10g
Glucose 10g
K2Hpo4 12g
Citrate d'ammonium 4g
Acétate de sodium 10g
Sulfate de magnésium 1.12g
Sulfate de manganèse 0,24 g
Tween 80 (Polysorbate 80) : 4g
Tryptone 5g
Sulfate furreux 0.12g
Saccharose 7g
Fructose 7g
Agar 20g
Eau distillée 1000ml

- Iliker (PH=6.8)

Tryptone 20g
Extrait de levure 5g
Gelatine 1.5g
Glucose 5g
Lactose 5g
Saccharose 5g
Chlorure de sodium 4g
Acétate de sodium 1.5g
Acide ascorbique 0.5g
Eau distillée 1000ml

- Esty broth

Peptone 10 g
Extrait de levure 3g
Glucose 5g
Nacl 5g
Agar 15g
Eau distillée 1000ml

- Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :
- Agitateur électrique
- Autoclave
- Bain Marie
- Balance
- Etuves
- Micropipettes

ANNEXES .

- Microscope optique
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex électrique
-Bec bunsen
-Boites pétri