



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## **Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE : SCIENCES**

**DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES**

### **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par : Bensaada Rihab**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)**

**FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES**

**OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE**

#### **Thème**

**Etude du pouvoir technologique de quelques  
isolats d'*Enterococcus* spp. d'origine  
alimentaire**

#### **Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>qualité</b>
Mr. Laouadi Mourad	MAA	Président
Mr Moukhtar Rahmani M	MAA	Examineur
Mr. Houicher Abderrahmane	MCA	Rapporteur

**Promotion : Juin – 2019**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

## مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: بن سعدة رحاب

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

### دراسة الكفاءة التكنولوجية لبعض عزلات المكورات المعوية (*Enterococcus spp.*) المنزوعة من الاغذية

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيد لعوادي مراد	استاذ مساعد "أ"	رئيسا
السيد مختار رحمانى محمد	استاذ مساعد "أ"	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	أستاذ محاضر "أ"	مقررا

الدفعة: جوان -2019

## ***Remerciement***

*Je remercie en premier lieu ALLAH*

*Louange à ALLAH Seigneur des mondes, qui m'a permis de réaliser ce*

*Travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.*

*Je tiens avant tout à remercier mon Encadreur Mr. Houicher.Abderrahmane qui a*

*Accepter de m'encadrer, qui m'a guider par ses précieux conseils et suggestions*

*Pertinentes et m'a bien expliqué les étapes de ce travail. Veuillez trouver ici,*

*L'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.*

*Je tiens également à remercier :*

*Les membres de jury pour avoir*

*Accepté d'examiner ce travail.*

*les responsables de laboratoire d'analyses microbiologique de spécialités agronomie universités*

*Ammar theledji qui nous ont fournis tous le nécessaire pour travailler dans les bonnes*

*conditions,*

*Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à*

*L'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes*

*Gratitudes et respects.*

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail à

Mes très chers parents que j'aime beaucoup, pour

Leurs sacrifices et soutiens tout au long de

Ma vie et aux quels je ne rendrai jamais assez

« Que Dieu les protège ».

Mes très chères frères Haitham et Mohamed amine.

Mes très chères sœurs Amina nour et Amani doaa qui m'ont

Toujours encouragé.

A mes grands mères, mes tantes, mes oncles, mes cousins, mes

Cousines, ainsi que toutes leurs familles.

A tous mes amis(es), mes copines et tous ce qui me connaissent de

Loin ou de prés.

Enfin à toute la promotion de master II Agroalimentaire et contrôle de qualités

عنوان المذكرة : دراسة الكفاءة التكنولوجية لبعض عزلات المكورات المعوية المنزوعة من الاغذية.

المؤطر:الد سيد هويشر عبد الرحمان

الإسم: رحاب

اللقب: بن سعدة

**ملخص:** الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو دراسة الفعالية التكنولوجية لثلاث عزلات من المكورات المعوية (Lb5 و KL1 و Zb3) المعزولة من منتجات الحليب المخمر تقليدياً. أظهرت دراسات الحموضة ومقاومة العصارة الصفراء ان العزلات التي تم اختبارها حساسة لمعدل الحموضة 4 و قابلة للتكيف مع أملاح الصفراء خلال فترة الاختبار. بالإضافة إلى ذلك ، لم يتم اكتشاف أي إنتاج للأمينات الحيوية (الهستامين وتيرامين) في عزلات المكورات المعوية التي تم اختبارها ، باستثناء *Enterococcus spp. KL1*. كلا من العزلتين KL1 و Zb3 قامتا بتحليل الجلوتين وهذا دليل على وجود انزيم الجلوتين، ومع ذلك لم يتم الكشف عن التحلل للجلوتين لعزل Lb5. كما أظهر اختبار مقاومة مضادات الميكروبات حساسية عالية لجميع العزلات للمضادات الحيوية التي تم اختبارها ، وخاصة الفانكوميسين. في هذه الدراسة ، لم يتم اكتشاف أي تفاعل للدم (انحلال الدم) في المكورات المعوية (KL1 و Zb3) ، باستثناء العزلة Lb5 الذي أظهر انحلال الدم من النوع β. من ناحية أخرى ، كشفت دراسة قوتها المضادة للميكروبات أن جميع العزلات *Enterococcus spp.* حالت دون اختبار نمو السلالات المسببة للأمراض الأربعة بدرجات متفاوتة. بناءً على هذه النتائج، تم اختيار (*Enterococcus spp. Zb3*) لمزيد من الفحص بناءً على جوانب سلامتهم قبل استخدام هذه البكتيريا و/أو خلاصاتها في الاغذية

**كلمات مفتاحية** المكورات المعوية ، الكفاءة التكنولوجية ، الامن الصحي ، نشاط مضادات الميكروبات.

---

**Memory title:** the study of technological properties of some strains of *Enterococcus* spp from food origin.

**Name : Bensaada      First name : Rihab      Directed by : Dr. Houicher Abderrahmane**

**Abstract :** The main objective of this paper is to evaluate the technological properties of three isolates of *Enterococcus* (Lb5, KL1 and Zb3) from traditionally fermented milk products. The results of the acidity and the bile salts resistance showed a considerable susceptibility of these isolates to pH 4 and tolerance of bile salts during the incubation time. In addition, no production of biogenic amines (histamine and tyramine) was detected in the enterococcal isolates tested, with the exception of *Enterococcus* spp. K11. Both isolates KL1 and Zb3 hydrolyzed gelatin, indicating the presence of gelatinase. However, no hydrolysis of gelatin was detected for the isolate Lb5. The antibiotic resistance test also showed a high sensitivity of all isolates to the antibiotics tested, especially vancomycin. In this study, no haemolytic reaction ( $\gamma$  haemolysis) was detected in the enterococci tested (K11 and Zb3), with the exception of the Lb5 isolate that showed  $\beta$  hemolysis. On the other hand, the study of their antimicrobial activities revealed that all supernatants of *Enterococcus* spp. inhibited the growth of the four pathogenic strains tested with varying degrees depending on the isolates. Based on these results, one isolate (*Enterococcus* spp.Zb3) was selected for further investigation based on their safety aspects prior to the use of this bacterium and/or its extract in the food matrices.

**Key words** *Enterococcus*, Technological aptitude, Safe aspect, Antimicrobial activity.

**Titre du mémoire : Etude de pouvoir technologique de quelques isolats d'*Enterococcus* spp.d'origine alimentaire**

**Nom: Bensaada**

**Prénom: Rihab**

**Encadreur: Dr. Houicher Abderrahmane**

**Résumé :** Le présent travail a pour objectif principal d'étudier de pouvoir technologique de trois isolats d'*Enterococcus* (Lb5, KL1 et Zb3) isolés à partir des produits laitier fermentés traditionnellement. L'étude de la résistance à l'acidité et aux sels biliaries montre une sensibilité considérable de ces isolats au pH 4 et une tolérance aux sels biliaries durant le temps d'incubation. De plus, aucune production d'amines biogènes (histamine et tyramine) n'a été détectée dans les isolats d'entérocoques testés, à l'exception d'*Enterococcus* spp. K11. Les deux isolats KL1 et Zb3 ont dégradé la gélatine, ce qui indique la présence de gélatinase. Cependant, aucune hydrolyse de gélatine n'a été détectée pour l'isolat Lb5. Le test d'antibiorésistance a montré également une sensibilité élevée de tous les isolats aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine. Dans cette étude, aucune réaction hémolytique ( $\gamma$  hémolyse) n'a été détectée dans les entérocoques testés (K11 et Zb3), à l'exception de l'isolat Lb5 qu'a montré une hémolyse de type  $\beta$ . D'autre part, l'étude de leur pouvoir antimicrobien a révélé que tous les surnageants d'*Enterococcus* spp. testés ont inhibé la croissance des quatre souches pathogènes testées avec des degrés variables selon les isolats. Sur la base de ces résultats, un isolat (*Enterococcus* spp. Zb3) a été sélectionné pour des études plus approfondies en fonction de leur aspects sécuritaires avant l'utilisation de cette bactérie et/ou leur extrait dans les matrices alimentaires.

**Mots clés :** Entérocoque, Aptitude technologique, Aspect sécuritaire, Activité antimicrobienne.

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b>	Prélèvement et l'ensemencement des souches d'entérocoques (photo originale)	<b>15</b>
<b>Figure 02 :</b>	Dépôt des disques d'antibiotiques (photo originale)	<b>16</b>
<b>Figure 03 :</b>	Mélange de sang humain avec la gélose (photo originale)	<b>17</b>
<b>Figure 04 :</b>	L'ensemencement d'entérocoques en stries (photo originale)	<b>17</b>
<b>Figure 05 :</b>	Centrifugation des souches d'entérocoques (photo originale)	<b>18</b>
<b>Figure 06 :</b>	Filtration de surnageant (à gauche) ; récupération de surnageant (à droite) (photo originale)	<b>19</b>
<b>Figure 07 :</b>	Observation microscopique d' <i>Enterococcus</i> spp. après coloration de Gram ( $\times 1000$ )	<b>20</b>
<b>Figure 08 :</b>	Résultats de la résistance d' <i>Enterococcus</i> spp au pH acide	<b>21</b>
<b>Figure 09 :</b>	Résultats de la résistance d' <i>Enterococcus</i> spp aux sels biliaires	<b>22</b>
<b>Figure 10 :</b>	Résultats de production des amines biogènes (histamine et tyramine	<b>24</b>
<b>Figure 11 :</b>	Résultats de test de gélatinase d' <i>Enterococcus</i> spp.	<b>25</b>
<b>Figure 12 :</b>	Mesure des zones d'inhibition aux antibiotiques mesurées à l'aide de pied à coulisse	<b>26</b>
<b>Figure 13 :</b>	Activité hémolytique d'entérocoques	<b>27</b>
<b>Figure 14 :</b>	Activité antimicrobienne des entérocoques	<b>29</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01 :</b>	Présentation des isolats d' <i>Enterococcus</i> spp. sélectionnés pour cette étude	<b>13</b>
<b>Tableau 02 :</b>	Résultats de la résistance d' <i>Enterococcus</i> spp. au pH acide	<b>21</b>
<b>Tableau 03 :</b>	Résultats de la résistance d' <i>Enterococcus</i> spp .aux sels biliaires	<b>23</b>
<b>Tableau 04 :</b>	Résultats de production des amines biogènes et de gélatinase	<b>23</b>
<b>Tableau 05 :</b>	Résultats d'antibiorésistance des isolats d' <i>Enterococcus</i> spp.	<b>26</b>
<b>Tableau 06 :</b>	Résultat de l'activité hémolytique des entérocoques sélectionnés	<b>27</b>
<b>Tableau 07 :</b>	Résultat de l'activité antimicrobienne des <i>Enterococcus</i> spp.	<b>28</b>

## Liste des abréviations

<b>AB</b>	Amines biogènes
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>API 20</b>	Analytical profile index
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>DO</b>	Densité optique
<b>GRAS</b>	Généralement Reconnu comme Sûr
<b>HDA</b>	Histidine decarboxylase agar
<b>PDA</b>	Gélose dextrosée à la pomme de terre
<b>TDA</b>	Tyrosine decarboxylase agar
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonies
<b>pH</b>	Potentiel d'Hydrogène

## Table des matières

Résumé	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
<b>Introduction</b>	1

### Partie Bibliographique

#### Chapitre I : *Enterococcus* spp

I.1. Généralités sur <i>Enterococcus</i> spp	3
I.2. Taxonomie d' <i>Enterococcus</i>	3
I.3. Habitat et principaux caractéristiques d' <i>Enterococcus</i>	4
I.4. Intérêt et utilisation d' <i>Enterococcus</i>	5

#### Chapitre II. Pouvoir technologique des *Enterococcus* spp.

II.1. Résistance à l'acidité gastrique	7
II.2. Résistance aux sels biliaires	7
II.3. Production des amines biogènes	8
II.4. Production de gélatinase	8
II.5. Résistance aux antibiotiques	9
II.6. Activité hémolytique	10
II.7. Activité acidifiante	10
II.8. Propriétés antimicrobienne	11

### Partie Expérimentale

1. Matériel et Méthodes	13
1.1. Matériel biologique	13
1.2. La résistance au pH acide et aux sels biliaires	13
1.2.1. La résistance au pH acide	13
1.2.2. La résistance aux sels biliaires	14

<b>1.3. La production des amines biogènes (histamine et tyramine)</b>	14
<b>1.4. La production de gélatinase</b>	14
<b>1.5. Pouvoir d'antibiorésistance</b>	15
<b>1.6. Activité hémolytique</b>	16
<b>1.7. L'activité antimicrobienne</b>	17
<b>1.7.1. Préparation des suspensions bactériennes</b>	17
<b>1.7.2. Préparation des suspensions fongiques</b>	18
<b>1.7.3. Préparation de surnageant des entérocoques</b>	18
<b>1.7.4. L'évaluation de l'activité antimicrobienne</b>	19
<b>2. Résultats</b>	20
<b>2.1. La résistance au pH acide et aux sels biliaires</b>	20
<b>2.1.1. La résistance au pH acide</b>	20
<b>2.1.2. La résistance aux sels biliaires</b>	22
<b>2.2. Production des amines biogènes</b>	23
<b>2.3. Test de gélatinase</b>	24
<b>2.4. Pouvoir d'antibiorésistance</b>	25
<b>2.5. Test d'hémolyse</b>	27
<b>2.6. Activité antimicrobienne</b>	28
<b>3. Discussion</b>	30
<b>Conclusion</b>	34
<b>Références Bibliographiques</b>	35



# Introduction

Les aliments, les micro-organismes et l'être humain ont vécu une longue et intéressante association, qui s'est développée bien avant l'histoire écrite. Depuis les années 1900, la production d'aliments fermentés et par conséquent la demande de cultures starter de bactéries lactiques a été largement accrue. Une attention à la relation entre l'alimentation et la santé a augmenté et par conséquent le marché des aliments fonctionnels a montré une croissance remarquable au cours des dernières années (Leroy et De Vuyst, 2004). Pourtant, les additifs alimentaires sont nécessaires pour la conservation des produits alimentaires et l'amélioration des propriétés organoleptiques, leur utilisation présente un certains danger. Ceci a conduit à l'utilisation des bactéries lactiques capables de produire des substances antimicrobiennes, des polymères de sucre, des édulcorants, des composés aromatiques, des enzymes utiles, ou des bactéries lactiques avec des propriétés favorisant la santé, appelées souches probiotiques, afin de remplacer les additifs chimiques par des composés naturels, en même temps, fournir au consommateur de nouveaux produits alimentaires (Leroy et De Vuyst, 2004).

Les entérocoques, constituants du tractus gastro-intestinal humain, sont répandus dans divers aliments crus, en particulier d'origine animale. Ils peuvent être fréquemment associés aux aliments fermentés (Franz et *al.*, 2003), y compris les saucisses, les fromages et le lait fermenté (Foulquié et *al.*, 2006; Yoon, Kim et Hwang, 2008). En général, la présence d'entérocoques dans les produits alimentaires est considéré comme un de contamination fécale, mais plus récemment, ils ont été acceptés comme faisant partie de la flore normale et sont couramment utilisés comme probiotiques (Mercenier et *al.*, 2003). Les propriétés bénéfiques des entérocoques pour les consommateurs résultent de leurs traits biochimiques spécifiques (Giraffa, 2003). Ce genre est connu pour ses activités protéolytiques (Arizcum et *al.*, 1997; El-Ghaish et *al.*, 2010), associés à la maturation et au développement des arômes dans les fromages (Psoni et *al.*, 2006; Renye, et *al.*, 2008).

L'emploi des entérocoques comme probiotiques est potentiellement possible puisqu'ils appartiennent aux bactéries lactiques et font partie intégrante de la flore commensale de l'homme et des animaux. (Bellomo et *al.*, 1980). Plusieurs aspects, y compris les propriétés fonctionnelles et technologiques et la sécurité des souches doivent être pris en compte lors de la sélection des souches probiotiques. Les critères de sélection des probiotiques comprennent le manque de pathogénicité, la tolérance aux conditions gastro-intestinales (acidité et sels biles), capacité à

adhérer à la muqueuse gastro-intestinal et l'exclusion compétitive des agents pathogènes (Collins et *al.*, 1998; Ouwehand et *al.*, 2002).

Dans ce contexte que s'inscrit la présente étude qui a pour objectif principal d'étudier le pouvoir technologique de quelques isolats d'entérocoques isolés à partir des produits laitier fermentés traditionnellement. L'étude consiste à évaluer la résistance des *Enterococcus* spp. au pH acide et aux sels biliaires, la production de gélatinase, la production des amines biogènes et plus précisément l'histamine et la tyramine, la résistance aux antibiotiques, et plus particulièrement la vancomycine, et enfin, le pouvoir hémolytique des isolats ainsi que leur activité antimicrobienne. Cette étude se compose de 3 parties dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les *Enterococcus* spp. et leurs aptitudes technologiques, la deuxième est intéressée au matériel et aux méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, la dernière partie est traitée les différents résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que leur discussion, et enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

## *Partie Bibliographique*

## **Chapitre I. *Enterococcus* spp.**

### **I.1 Généralités sur *Enterococcus* spp.**

Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la conservation des aliments en raison d'une part, de leur pouvoir acidifiant (acide lactique) qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques et, d'autre part, grâce à leur capacité de produire d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines. Les bactéries lactiques sont employées traditionnellement dans la fermentation de végétaux, de produits laitiers ou carnés et en panification (Chen et al., 2003).

*Enterococcus* sont considérés comme des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, ainsi que dans une variété de produits alimentaires (Chen et al., 2003). Ils sont commensales de l'homme présents dans la bouche, les voies biliaires, la cavité vaginale, mais leur localisation principale reste le tractus intestinal; ils sont retrouvés dans les selles de plus de 90% des adultes sains (Murray, 1990). Ils peuvent coloniser les voies respiratoires supérieures et la région périnéale (Lewis et Zervos, 1990).

Les entérocoques sont utilisés depuis des siècles dans la transformation des aliments et impliqués dans la fermentation de nombreux aliments (lait, végétaux, viandes et poissons). Ils sont capables de produire diverses molécules antimicrobiennes (acide lactique, bactériocine ou encore peroxyde d'hydrogène). Ces propriétés les rendent indispensables à l'industrie agroalimentaire. Ce genre bactérien produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires (Aguilar et al., 2010).

### **I.2 Taxonomie d'*Enterococcus***

Thiercelin a décrit l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme en 1899 (Thiercelin, 1899), appelée initialement *Streptococcus faecalis* (Andrewes et Horder, 1906). Mais ce n'est qu'en 1984 le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* selon les résultats des techniques de chimio-taxonomie et de génétiques moléculaires : hybridation ADN-ADN ou

ADN-rARN, et séquençage des oligonucléotides de la sous unité 16S de ARN des ribosomes (Garvie *et al.*, 1981 ; Kilpper *et al.*,1982 ; Farrow *et al.*,1983 ; Schleifer *et al.*,1984 ; Ludwig *et al.*,1985). Actuellement, 44 espèces forment le genre *Enterococcus* de la famille des *Enterococcaceae*, ordre *Lactobacillales* issue de l'embranchement des Firmicutes (Aguilar *et al.*, 2012 ). Les deux espèces le plus fréquemment isolées de produits laitiers sont *E. faecium* et *E. faecalis* (Franz *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 2001). *E. durans* est rencontré à moindre étendue dans le lait et les produits fromagères, alors que *E. hirae* et *E. casseliflavus* sont aussi occasionnellement rencontré (Franz *et al.*, 1999). Il a été démontré que *E. durans* est aussi fréquemment isolée de produits laitiers (Andrighetto *et al.*, 2001).

### **I.3. Habitat et principales caractéristiques d'*Enterococcus* spp.**

Les entérocoques, autrefois classés avec les streptocoques, sont reconnus d'origine fécale depuis le début du siècle. Le genre *Enterococcus* comprend des cocci à Gram positif à catalase négative, généralement des bactéries anaérobies facultatives qui se développent dans 6,5% de NaCl, 40% de sels biliaires, de lait renfermant 0,1 % de bleu de méthylène, et à pH 9,6. Ils poussent à 10 °C et 45 °C et peuvent résister 30 min à 60 °C (Schleifer *et al.*,1984, Schleifer *et al.*,1987). Au cours des deux dernières décennies, les entérocoques ont été identifiés de plus en plus fréquemment comme des agents d'infection nosocomiale (Mundy *et al.*, 2000 ;Clewel, 1990). Ces organismes ont survécu en milieu hospitalier en raison de leur résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques couramment utilisés. et plus important encore, leur capacité à acquérir une résistance à tous les antibiotiques actuellement disponibles, soit par mutation, soit par réception de matériel génétique étranger par transfert de plasmides et de transposons (Upadhyaya *et al.*.,2009 ; Chlebicki *et al.*,2008 ; Kainer *et al.*,2007).

Les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette (Schleifer *et al.*, 1984). Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* (Higashide *et al.*, 2005). La plupart des espèces du genre *Enterococcus* font partie intégrante de la flore intestinale de nombreux animaux, leur concentration dans les matières fécales peut varier de 10<sup>5</sup> à 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> (Kayser, 2003). Les entérocoques les plus fréquemment isolés dans les fèces de l'homme sont *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* (Murray, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1996). Dans la plupart des contenus intestinaux

d'animaux (la volaille, les bovins, les porcs, les chiens, les chevaux, les moutons), *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae* sont représentés; par contre, chez les chèvres et les lapins, on ne retrouve que *E. faecalis* et *E. hirae* (Devriese et al., 1987). Dans des échantillons provenant de sources environnementales (composts, eaux usées, sédiments et eaux de piscine), il a été démontré que les espèces prédominantes sont *E. faecalis* (40 %) et *E. faecium* (30 %), suivies de *E. durans*/*E. hirae*, *E. casseliflavus*/*E. gallinarum* et *E. raffinosus*, avec une prévalence différente de l'espèce selon la source Pinto et al., (1999).

D'autre part, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* sont des bactéries qui ont été isolées d'échantillons végétaux d'ensilage d'herbe (Leclerc et al., 1996). De plus, *E. mundtii* a été trouvé dans de la chicorée fraîche (Bennik et al., 1998) et des graines de soja (De Kwaadsteniet et al., 2005 ; Todorov et al., 2005 ; Zendo et al., 2005).

#### **I.4. Intérêt et utilisation d'*Enterococcus***

Les entérocoques sont des microorganismes naturels des aliments et jouent un rôle important dans l'affinage et l'amélioration du goût du fromage et des saucisses. Ils ont été utilisés comme probiotiques pour améliorer l'équilibre microbien du tractus intestinal chez les humains et les animaux. Bien que le genre *Enterococcus* soit responsable d'effets bénéfiques sur les aliments, il n'est pas considéré comme «Généralement Reconnu comme Sûr» (GRAS), en raison de son utilisation comme indicateur de la contamination fécale et de son association fréquente avec des maladies d'origine alimentaire (Franz et al., 2003 ; Marcinek et al., 1998) .

Des études de la microflore des produits traditionnels ont montré que les entérocoques jouent un rôle important dans la fermentation et la maturation de certains produits en contribuant au développement des caractéristiques organoleptiques telles que le goût et l'arôme. En plus de la contribution sensorielle, les entérocoques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes, y compris les bactériocines. Ils peuvent aussi avoir des propriétés probiotiques. (Franz et al., 2003 ; Marcinek et al., 1998).

- **Applications des entérocoques dans les produits laitiers**

L'utilisation des entérocoques dans les fromages est très controversée. Les études sur la microflore des fromages traditionnels dans les pays méditerranéens, qui sont produits principalement à partir du lait cru de brebis ou de chèvre, et moins fréquemment à partir de lait de vache, ont indiqué que les entérocoques jouent un rôle important dans la maturation de ces fromages, probablement par la protéolyse, la lipolyse, et l'utilisation du citrate, contribuant ainsi à leur goût et leur saveur typique, Ils sont également présents dans d'autres produits alimentaires fermentés, telle que les saucisses (Franz et *al.*, 1999 , 2003 ; Giraffa, 2002; Hugas et *al.*, 2003) et les olives (Fernandez ,1983;Franz et *al.*, 1996, 1999 ; Floriano et *al.*, 1998 ; Ben Omar et *al.*, 2004). Les entérocoques ont la capacité de produire des bactériocines «entérocoques», qui sont de petits peptides avec une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives étroitement apparentés, y compris d'altération ou les bactéries pathogènes telles que *Listeria* (De Vuyst et Vandamme, 1994).

En plus de leur rôle dans la microbiologie environnementale, clinique et alimentaire, les entérocoques ont été utilisés comme probiotiques susceptibles d'améliorer la santé intestinale et de diminuer le taux de cholestérol (Giraffa, 2003; Hlivak et *al.* 2005). La sélection des probiotiques dépend des caractéristiques essentielles, telles que la capacité de survivre dans un environnement difficile du tractus gastro-intestinal où le pH est acide, en présence de la bile et leur capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale (Dunne et *al.* 2001).

## **Chapitre II. Pouvoir technologique des *Enterococcus* spp.**

### **II.1. Résistance à l'acidité gastrique**

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les pH acides. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007). Les souches probiotiques les plus utilisées pour l'homme ont une origine gastro-intestinale humaine et le plus souvent appartiennent à des espèces des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Cependant, des souches appartenant à d'autres espèces lactiques, y compris les entérocoques, ont aussi été utilisées dans le passé en tant que probiotiques (Fuller, 1989 ; O'Sullivan et al., 1992 ; Holzapfel et al., 1998). Au cours des dernières décennies, on a soulevé un intérêt croissant en ce qui concerne l'utilisation des entérocoques ayant des propriétés technologiques et métaboliques souhaitables comme culture starter, culture adjuvante ou probiotiques, en raison de leur capacité à survivre et à rivaliser dans le tractus gastro-intestinal (Franz et al., 2011 ; Martín et al., 2009). Ce rôle bénéfique a conduit à l'inclusion des souches entérocoques dans certaines cultures starter (Parente et al., 1989, Centeno et al., 1999, Menendez et al., 2004). Giraffa (2003) a rapporté que la persistance des entérocoques pendant l'affinage du fromage peut être attribuée à leur grande tolérance aux différents stress, notamment au stress acide (entre pH 4,0 et 9,6). En général, la bactérie peut réagir au stress acide soit en limitant l'entrée des acides dans son cytoplasme soit en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés ou en alcalinisant le milieu intracellulaire.

### **II.2. Résistance aux sels biliaires**

La sécrétion gastrique constitue le premier mécanisme de défense contre la majorité des micro-organismes ingérés. Les sels biliaires sont connus comme des détergents naturels qui émulsionnent et solubilisent les lipides, jouant ainsi un rôle crucial dans la digestion et l'absorption des graisses (Ruiz et al., 2013) . Les sels biliaires peuvent induire des lésions membranaires et altérer les fonctions membranaires des bactéries intestinales. En plus d'attaquer la membrane cellulaire, les sels biliaires ont de nombreux autres effets toxiques sur les bactéries, perturbant la stabilité des macromolécules et induisant un stress oxydatif, et des dommages à

l'ADN bactérienne (Ruiz et *al.*, 2013). Ainsi, la capacité d'adaptation et de réponse à la bile, les sels sont essentiels à la survie et à la persistance des bactéries intestinales dans le tractus gastro-intestinal. Un niveau de sel biliaire de 0,3% est considéré comme la concentration appropriée utilisée pour la sélection de souches résistantes et d'espèces probiotiques à usage humain (Pancheniak et Soccol, 2005). La capacité des entérocoques à se développer en présence des sels biliaires pourrait être liée à la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH) qui est une enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires (Begley et *al.*, 2006 ; Hamon et *al.*, 2011).

### **II.3. Production des amines biogènes**

Les amines biogènes (AB), aussi appelées amines naturelles, sont des bases azotées de faible poids moléculaire. (Burdychova et *al.*, 2007). Malgré les AB sont d'origine endogène dans les aliments tels que les fruits, les légumes, le lait, la viande (Leuschner et *al.*, 1999 ; McCabe Sellers et *al.*, 2006), peuvent être des agents de certains nombres d'intoxication alimentaire, en particulier les intoxication par l'histamine «intoxication histaminique» et les intoxication de la tyramine «réaction de fromage ». Les entérocoques peuvent provoquer une intoxication alimentaire liée à la production d'amines biogènes et peuvent constituer un réservoir d'infections opportunistes inquiétantes et de traits de virulence. Clairement, il n'y a pas consensus sur l'acceptation de leur présence dans les denrées alimentaires et de leur rôle en tant que pathogènes primaires toujours un point d'interrogation (Franz et *al.* 1999; Giraffa 2002, 2007). Il existe d'autre forme des amines biogènes dans le domaine alimentaire citant comme exemples la tryptamine, le p-phényléthylamine, la spermine et la spermidine (Shalaby, 1999). En effet, la production d'amines biogènes semble être une activité défavorable des entérocoques dans les produits laitiers fermentés, car les amines biogènes ont été associées à un certain nombre d'épisodes d'intoxication alimentaire (Karovacova et Kohajdova, 2005). Il est donc important de sélectionner des souches sûres, non productives d'amines biogènes, afin d'utiliser comme culture starter ou probiotiques.

### **II.4 . Production de gélatinase**

La gélatinase est une métallo-endopeptidase extracellulaire impliquée dans l'hydrolyse de la gélatine, du collagène, de l'hémoglobine et d'autres peptides bioactifs (Su et *al.*, 1991). Cette

enzyme est produite par un microorganisme hydrolysant la gélatine en sous composés (polypeptides, peptides et acides aminés) pouvant traverser la membrane cellulaire et être utilisés par l'organisme (Joyce et al., 2017). La production de gélatinase a augmenté la pathogénicité chez un modèle animal (Singh et al., 1998), ce qui confirme son rôle dans la virulence. En outre, la gélatinase peut cliver la fibrine, ce qui pourrait avoir d'importantes répercussions sur la virulence d'*E. faecalis*, car la protéase sécrétée peut endommager le tissu hôte et permettre ainsi la migration et la propagation des bactéries. Waters et al., (2003) ont suggéré que les entérocoques présents dans les infections sanguines et les biofilms formés lors d'une endocardite étaient susceptibles d'être recouverts de fibrine polymérisée. La présence de gélatinase parmi les souches alimentaires d'*E. faecalis* est élevée (Eaton et Gasson, 2001; Franz et al., 2001). Cependant, Eaton et Gasson (2001) ont démontré que même lorsque le gène gélatinase est présent, un phénotype négatif peut être trouvé. Aucune des souches d'*E. faecium* impliquées dans les deux études ne produit pas de gélatinase. Il est donc important de sélectionner des souches sûres, non productives de gélatinase, afin d'utiliser comme culture starter ou probiotiques.

## II.5 . Resistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques englobe la résistance naturelle (intrinsèque) et la résistance acquise (transférable). Les entérocoques possèdent un large spectre de résistances aux antibiotiques au sein de ces deux types. La résistance fréquente des entérocoques aux antibiotiques couramment utilisés et le risque de transmission de gènes résistants aux antibiotiques sont particulièrement une préoccupation majeure pour une utilisation sans danger dans les aliments ou tant qu'agents de lutte biologique (Giraffa, 2003). Exemple de résistance intrinsèque, est la résistance à la vancomycine (type VanC) chez *Enterococcus*. La vancomycine a été utilisée comme médicament de choix dans de nombreuses souches d'infections bactériennes à Gram positif, notamment celles causées par des entérocoques. Le nombre d'entérocoques résistants à la vancomycine a augmenté récemment. L'organisme peut également transférer horizontalement ce déterminant à d'autres espèces sensibles à la vancomycine (Desai et al., 2001 ; Sreeja et al., 2012). Abriouel et al. (2008) ont rapporté sur la résistance à l'ampicilline et à la pénicilline chez les *Enterococcus*, en particulier *E. faecium* et *E. faecalis*. Par exemple, les entérocoques peuvent développer une résistance accrue aux pénicillines par l'acquisition de  $\beta$ -lactamase. De plus, la résistance la plus répandue parmi les entérocoques isolés des produits

laitiers dans la Littérature était également celle à la tétracycline. Cette résistance peut être attribué à l'utilisation ré pondue et excessive de cet antibiotique dans les pratiques vétérinaires (Pieniz et *al.*, 2015). D'une manière générale, il pourrait y avoir un lien entre l'utilisation de certains antibiotiques chez les animaux d'élevage et la colonisation des êtres humains par antibiorésistance via la chaîne alimentaire. Pour des raisons de sécurité, un critère essentiel est de vérifier l'absence de résistance aux antibiotiques transférable chez les entérocoques, qui pourrait être utilisée comme culture starter ou probiotiques, car elle est spécifique pour la souche (Franz et *al.*, 2001; Vancanneyt et *al.*, 2002; De Vuyst et *al.*, 2003).

## **II.6. Activité hémolytique**

La cytolysine ou  $\beta$ -hémolysine est le facteur de virulence le plus étudié. Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire. La production de cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques pathogènes, ce mécanisme de lyse étant une stratégie bactérienne pour contourner les réactions immunitaires chez l'hôte (Le Blanc, 2006). La fréquence de mortalité causée par une infection par les entérocoques  $\beta$ -hémolytiques est cinq fois supérieure à celle observée par une infection à entérocoques non- $\beta$ -hémolytiques (Huycke et *al.*, 1991). Une étude suggère que la combinaison d'hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une mortalité accrue dans l'endocardite due à *E. faecalis* (Chow et *al.*, 1993). Donc, il important que les souches d'*Enterococcus*, en particulier celle présentant un potentiel d'application dans les aliments, doivent être vérifié pour la présence d'hémolysine (Jack et *al.*, 1995; Jett *al.*, 1994). L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité (De Vuyst et *al.*, 2003).

## **II.7. Activité acidifiante**

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries des levains de fromagerie est leur aptitude à l'acidification du lait qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acidité développée. Plusieurs travaux sur l'aptitude des entérocoques à acidifier le lait ont été rapportés. En général, les entérocoques présentent une faible activité acidifiante du lait. Morea et *al.*, (1999) ont montré que le pH du lait après 24 h d'inoculation avec des souches

isolées à partir du fromage Mozzarella n'a pas baissé en dessous de 5,5. Des recherches récentes sur des entérocoques isolés du lait ont confirmé leur faible pouvoir acidifiant dans le lait avec seulement quelques souches présentant un pH inférieur à 5,0-5,2 après 16-24 h d'incubation à 37 °C (Andrighetto et al., 2001 ; Durlu et al., 2001 ; Sarantinopoulos et al., 2001). Il a été également observé que l'espèce *E. faecalis* est généralement apte à acidifier le lait plus fort que l'espèce *E. faecium*. Chez des souches *E. faecalis* isolées d'un fromage traditionnel italien, un pouvoir acidifiant élevé dans le lait écrémé avec un abaissement du pH à environ 4,5 après 24 h de la fermentation a été observé (Giraffa et al., 1993 ; Suzzi et al., 2000). Il semble donc y avoir effectivement chez les entérocoques une aptitude à l'acidification caractéristique de l'espèce.

## **II.8. Propriétés antimicrobienne**

De nombreuses espèces d'*Enterococcus* produisent un grand nombre et diverses classes de peptides antimicrobiens utiles ou d'entérocoques (Foulquié et al., 2006). Les entérocoques sont un large groupe de bactériocines produites par des espèces d'entérocoques, qui ont montré une activité bactéricide contre les agents pathogènes bactériens et fongiques (Floriano et al., 1998; Enan et al., 2012). En plus des entérocoques, les métabolites antimicrobiens comprennent les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyl. Les entérocoques produisent également des entérocoques de classe II qui sont de petites tailles, thermostables, peptides cationiques, hydrophobes et antibactériens (Nes, et Brurberg, 1996). Au cours des 10 dernières années, plusieurs articles ont été publiés sur les entérocoques producteurs de bactériocine, associés aux écosystèmes alimentaires (Batdorj et al., 2006; Hadji-Sfaxi et al., 2011; Leroy, et De Vuyst, 2003; Todorov et al., 2010). Les souches d'*Enterococcus* productrices de bactériocine peuvent jouer un rôle important dans la conservation naturelle des produits alimentaires en contrôlant, concurrençant et inhibant la croissance des bactéries pathogènes et d'altération. De nombreuses bactériocines associées à des entérocoques ont été décrits, citant l'entérocoque B (Casaus et al., 1997), entérocoques L50A et L50B (Cintas et al., 1998), entérocoque A (Aymerich et al., 1996), l'entérocoque P (Cintas et al., 1997) et beaucoup d'autres (Javed et al., 2011). Les entérocoques produites par les entérocoques présentent un grand intérêt en raison de leur activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus* spp. (Belgacem et al., Hosseini et al., 2009). De plus, Fhoula et al., (2013) ont confirmé l'efficacité antifongique des souches d'*Enterococcus* contre la plupart

des moisissures post-récolte testées (*A. niger*, *P. expansum* et *B. cinerea*) et ont mis en évidence leur utilisation potentielle en tant qu'agents de lutte biologique. Par conséquent, les entérocoques montrent également un potentiel d'application dans les aliments en tant que bio-conservateur ou protecteur cultures (Giraffa, 2003).

# **Partie Expérimentale**

## *Matériel et Méthodes*

## 1. Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire microbiologique n°08, département des Sciences Agronomiques-Université Ammar Thelidji Laghouat, pendant une période de quatre mois (de Décembre 2018 jusqu'au Mars 2019).

### 1.1. Matériel biologique :

Trois isolats d'*Enterococcus* spp. codés Ent Kl<sub>1</sub> (isolée à partir de Klila), Ent Zb<sub>3</sub> (isolée à partir de Zebda) et Ent Lb<sub>5</sub> (isolée à partir de Lben) ont été sélectionnés à partir de la collection des bactéries de projet de fin d'étude de Daoudi (2018). Ces entérocoques ont été isolés à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement (voir le tableau 1), identifiées partiellement à l'aide des galeries API 20 Strep et conservés à la température de congélation (-18°C) dans un milieu de conservation à 20% glycérol. Afin de confirmer les résultats d'identification d'entérocoques, ces isolats ont été re-testés par la coloration de gram et la catalase. Le tableau suivant résume l'ensemble des informations sur les isolats d'entérocoques sélectionnés.

**Tableau 01** : Présentation des isolats d'*Enterococcus* spp. sélectionnés pour cette étude.

Isolats	Identification*				
	Source	Gram	Forme	Catalase	Galerie API CH50
<b>Ent Kl1</b>	Klila	+	Cocci	-	<i>Enterococcus</i> spp. (90%)**
<b>Ent Lb 5</b>	Lben	+	Cocci	-	<i>Enterococcus</i> spp. (94%)
<b>Ent Zb3</b>	Zebda	+	Cocci	-	<i>Enterococcus</i> spp. (90%)

\* Travaux de projet de fin d'étude de Daoudi (2018).

\*\*Taux de similarité biochimique au profil d'*Enterococcus* spp.

### 1.2.La résistance au pH acide et aux sels biliaries :

#### 1.2.1. La résistance au pH acide :

Le protocole d'Ispirli et al. (2017) et d'Hyrominus et al. (2000) a été utilisé pour mesurer La résistance des entérocoques sélectionnés au pH acide en fonction du temps. Dans cet essai, une série des tubes contenant de bouillant BHI ajusté au pH 4 par l'addition de l'HCl 1 M. Ensuite, 1 ml de chaque isolat a été transféré dans 20 ml de ce bouillon pour obtenir une densité optique (DO<sub>600</sub>) de 0,1. Toutes les quatre heures, la croissance des

*Enterococcus* a été mesurée à une longueur d'onde  $\lambda=600$  pendant une incubation de 24 h à 37 °C (sans agitation) à l'aide d'un spectrophotomètre de type biochrom Libra S6. Notons que, des témoins sans inoculum ont été préparés pour ajuster le spectrophotomètre.

### **1.2.2. La résistance aux sels biliaires :**

L'effet des sels biliaires sur la croissance des entérocoques sélectionnés en fonction du temps a été déterminé par la méthode d' Ispirli et al. (2017) et d'Hyrominus et al. (2000). Les sels biliaires d'origine bovine ont été ajoutés au bouillon BHI à une concentration de 0,3 % (w/v) après l'autoclavage de ce milieu. Ensuite, un inoculum de 1 ml de chaque isolat a été transféré dans des tubes de 20 ml de BHIB afin d'obtenir une densité optique ( $DO_{600}$ ) de 0,1. Toutes les quatre heures, la croissance des *Enterococcus* spp. a été mesurée à une longueur d'onde  $\lambda=600$  pendant une incubation de 24 h à 37 °C (sans agitation).

### **1.3. La production des amines biogènes (histamine et tyramine) :**

Dans cette expérimentation, le protocole de Joosten et Northolt (1989) a été utilisé pour étudier le pouvoir de décarboxylation des acides aminés (histidine et tyrosine) par les isolats d'*Enterococcus* spp. La production des amines biogènes a été détecté sur des milieux spécifiques qui sont l'histidine decarboxylase agar (HDA) et la tyrosine decarboxylase agar (TDA). Le milieu est composé de 5 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 1 g de glucose, 0,5 ml de Tween 80, 0,2g de  $MgSO_4$ , 0,1 g de  $CaCO_3$ , 0,06 g de violet de bromocrésol, 0,05 g  $MnSO_4$ , 0,04 g de  $FeSO_4$ , 20 g d'agar et 20 g d'acide aminé spécifique (histidine ou tyrosine) préparé dans un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5, après stérilisation à 121 °C pendant 15 min.

Le milieu estensemencé en surface avec 0,1 ml de chaque culture bactérienne précédemment préparée dans le bouillon BHI. Un halo violet est interprété comme une réaction positive pour la production d'amines biogènes dans les milieux HDA ou TDA, après incubation à 37 °C pendant 24-48 h. Notons que, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, forte productrice d'amines biogènes, a été utilisée comme un témoin positif.

### **1.4. La production de gélatinase :**

Le milieu gélosé BHI contenant 10 g/l de peptone et 30 g/l de gélatine a été utilisé pour testé la production de gélatinase par les entérocoques conformément au protocole de Rivas et al. (2012). La surface du milieu spécifique estensemencée avec 100 $\mu$ l de chaque culture des *Enterococcus* spp. précédemment préparée. Après incubation à 37 °C pendant 24-48 h, les boîtes ont été placées à 4 °C pendant 5 h avant l'examen de la zone de turbidité

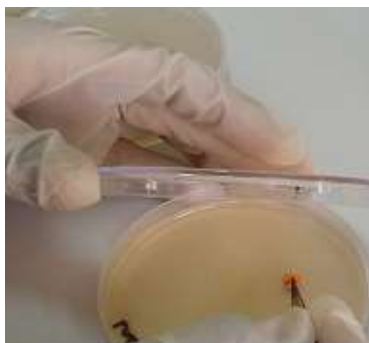
autour des colonies indiquant l'hydrolyse de la gélatine. La souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisée comme témoin positif dans cette essai.

### 1.5. Pouvoir d'antibiorésistance:

Sept antibiotiques ont été choisis pour étudier l'antibiorésistance des *Enterococcus* spp., et qui sont: Rifampicine (R, 30 µg), Penicilin-G (P, 10 µg), Tetracycline (TE, 30 µg), Ampicilline (Amp, 10 µg), Vanomycine (VA, 30 µg), Erythromycin (E, 15µg) et Chloromphenicol (C, 30 µg), utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par NCCLS (2004). Des cultures bactériennes (Ent Kl<sub>1</sub>, Ent Zb<sub>3</sub>, Ent Lb<sub>5</sub>) ont été préparées pour chaque isolat à partir des cultures d'une nuit dans un bouillon BHI à 37°C. Après l'incubation, 500 µl de chaque culture ont été transférées dans 10 ml d'eau physiologique (0,9 %) pour obtenir une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Ensuite, 100 µl de la suspension bactérienne précédemment préparée ont été ensemencées en surface du milieu gélosé Mueller Hinton (MHA). Puis, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur le milieu MHA à l'aide d'une pince stérile. Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibitions ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les résultats de la lecture sont exprimés en millimètre (mm) et notés comme suite : Sensible (S); Résistante (R) ; Intermédiaire (I) selon les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions décrites par NCCLS (2004) pour les entérocoques.



**Figure 01** : Prélèvement et l'ensemencement des souches d'entérocoques (photo originale)



**Figure 02 :** Dépôt des disques d'antibiotiques (photo originale)

### 1.6. Activité hémolytique

L'activité hémolytique des entérocoques a été mise en évidence par la méthode de DeVuyst et *al.* (2003). La surface de la gélose au sang additionnée du sang humain à 7% (v/v) estensemencée en surface avec 100  $\mu$ l de chaque suspension bactérienne (Ent Kl<sub>1</sub>, Ent Zb<sub>3</sub>, Ent Lb<sub>5</sub>) précédemment préparée. Après incubation à 37°C pendant 24-48 h, l'activité hémolytique est interprétée comme suit :

- la présence d'une zone claire d'hydrolyse autour des colonies (hémolyse totale):  $\beta$  hémolytique.
- absence de réaction hémolytique autour des colonies (absence d'hémolyse):  $\gamma$  hémolytique
- la présence d'une couleur verte autour des colonies (hydrolyse partielle):  $\alpha$  hémolytique.

Notons que, la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée dans cet essai comme un témoin de  $\beta$  hémolyse.



**Figure 03 :** Mélange de sang humain avec la gélose (photo originale)



**Figure 04 :** L'ensemencement d'entérocoques en stries (photo originale)

### **1.7. L'activité antimicrobienne:**

Pour évaluer le pouvoir antimicrobien des entérocoques, quatre souches de référence ont été choisies pour cette étude: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proviennent de la collection du Laboratoire Régional Vétérinaire de Laghouat. la souche fongique *Aspergillus parasiticus* CBS 100926 provient de la collection CBS culture collection of micro-organisms, tandis que *Penicillium expansum* MUCL 29192 est une souche de référence provient de la collection BCCM (Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms).

### 1.7.1. Préparation des suspensions bactériennes:

Les deux bactéries pathogènes ont été cultivées dans le bouillon BHI (Brain Heart Infusion) pendant 24 heures à 37 °C pour avoir des cultures jeunes. Ensuite, 0,1 ml de chaque culture ont été transférées dans 10 mL de solution saline stérile 0,9%. La densité optique (DO) a été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre (biochrom Libra S6) à une longueur d'onde  $\lambda=620$  nm pour obtenir une suspension de stock d'environ  $10^8$  UFC/mL.

### 1.7.2. Préparation des suspensions fongiques:

La suspension fongique pour chaque souche doit être préparée à partir d'une culture de 7-14 jours en milieu PDA à 25°C. Les spores ont été récupérées en imbibant un écouvillon stérile avec l'eau physiologique et le transféré dans 3 mL de solution saline stérile 0,9%. Ensuite, la densité optique a été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre (biochrom Libra S6) à une longueur d'onde  $\lambda=530$  nm pour obtenir une suspension de stock de  $0.4-5 \times 10^6$  spores/mL.

### 1.7.3. Préparation de surnageant des entérocoques :

La méthode de diffusion en puits sur gélose décrite par Magnusson et Schnurer (2001) a été utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des entérocoques vis-à-vis les bactéries et les moisissures pathogènes sélectionnées. Brièvement, les isolats d'*Enterococcus* spp. sélectionnés pour cette étude ((Ent Kl<sub>1</sub>, Ent Zb<sub>3</sub>, Ent Lb<sub>5</sub>) sont ensemencés dans des tubes contiennes un bouillon BHI et incubés à 37°C pendant 24h. Ensuite, les surnageants ont été obtenus par centrifugation de cultures de entérocoques à 12000 rpm pendant 10 min à l'aide de centrifugeuse (eppendorf 5415 D.), puis les surnageants ont été récupérés à l'aide d'une seringue et filtrés sur un filtre Millipore de 0,45  $\mu$ m. Enfin, les filtrats bactériens ont été conservés dans le congélateur du laboratoire à -18°C jusqu'à l'analyse.



**Figure 05 :** Centrifugation des souches d'entérocoques (photo originale)



**Figure 06 :** Filtration de surnageant (à gauche) ; récupération de surnageant (à droite) (photo originale)

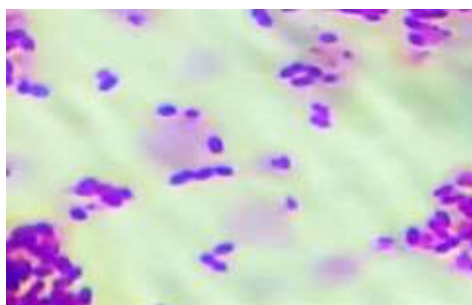
#### **1.7.4. L'évaluation de l'activité antimicrobienne :**

Des puits de 5 mm de diamètre ont été creusés à l'aide des emboues bleus dans le milieu gélosé BHI agar contenant  $10^6$  UFC/ml des souches bactériennes cibles, ainsi que dans le milieu PDA contenant  $0,4-5 \times 10^4$  spores/ml des souches fongiques testées. Ensuite, 100  $\mu$ l de surnageants ont été déposés dans ces puits. Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24h, les zones d'inhibition ont été notées et exprimées comme suit: ++, forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits; +, faible inhibition autour des puits; -, pas de zone d'inhibition.

## *Résultats*

## 2. Résultats

Avant d'étudier le pouvoir technologique des trois isolats de d'*Enterococcus* spp (KL1, Lb5 et Zb3) d'origine alimentaire, ils sont re-testés par la coloration de Gram et la catalase. Ces isolats sont révélés des cocci, disposées en paire ou en courtes chaînes isolées, Gram positives et catalase négative (Figure 07).



**Figure 07** : Observation microscopique d'*Enterococcus* spp. après coloration de Gram ( $\times 1000$ )

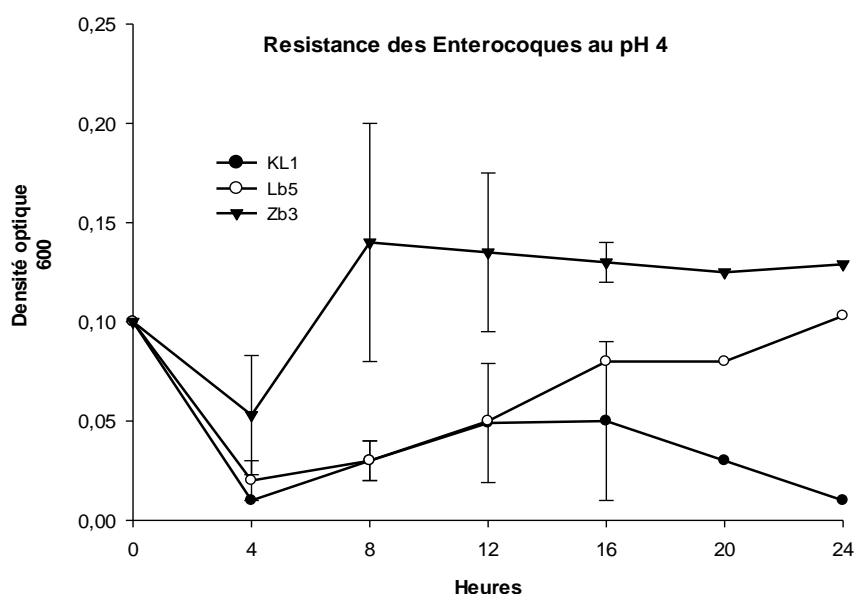
### 2.1. La résistance au pH acide et aux sels biliaries

L'effet des conditions de stress sur la croissance des isolats d'*Enterococcus* spp. a été évalué par l'étude de la croissance de ces isolats en milieu acide pH 4 et en présence des sels biliaries pendant 24 heures d'incubation à 37 °C.

#### 2.1.1. La résistance au pH acide

Les résultats de la résistance des isolats d'*Enterococcus* spp. (KL1, Lb5 et Zb3) au pH 4 sont présentés en détails dans le tableau 2 et la figure 08. Avec une légère variation en fonction de l'espèce d'*Enterococcus* spp. les isolats testés ont été mal poussés en milieu acide à pH 4, ce qui a révélé une faible croissance après 24 h d'incubation seulement pour les deux isolats Lb5 et Zb3 (voir tableau 02). Notons que, l'isolat *Enterococcus* spp. Zb3 semble être la plus résistante au pH 4, car sa croissance en milieu acide est plus rapide par rapport aux autres isolats testés. Elle atteint une valeur maximale de  $1,03 \times 10^8$  UFC/ml équivalent d'une  $DO_{600}$  égale 0,129 après 24 heures d'incubation. Alors que, la croissance de l'isolat *Enterococcus* spp. Lb5 en milieu acide est plus faible par rapport à l'isolat Zb3, car elle a commencé la croissance qu'après 16

heurs d'incubation et atteint une valeur maximale de  $10^8$  UFC/ml équivalent d'une  $DO_{600}$  égale 0,103 après 24 heures d'incubation.



**Figure 08 :** Résultats de la résistance d'*Enterococcus* spp au pH acide

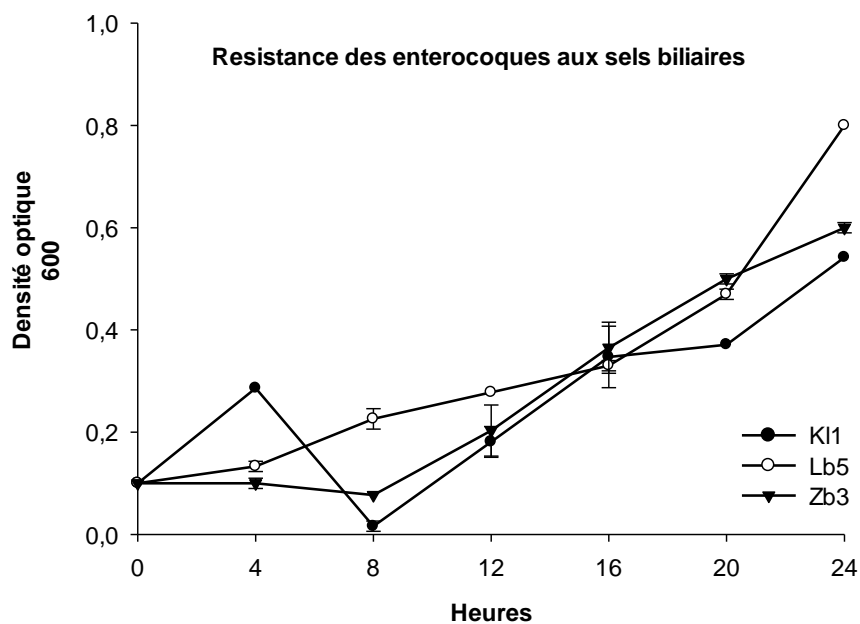
Cependant, l'isolat KL1 a affiché un temps de sensibilité remarquable au pH acide, puis une absence de croissance avec une mortalité bactérienne après 16 d'incubation. Donc, on remarque que toutes les *Enterococcus* spp. testées montrent une sensibilité considérable au pH 4 durant le temps d'incubation où leur croissance se stabilise après 24 heures d'incubation en milieu acide seulement pour les deux isolats Zb3 et Lb5.

**Tableau 02 :** Résultats de la résistance d'*Enterococcus* spp. au pH acide

Isolats	0h	4h	8h	12	16	20	24h
<i>Enterococcus</i> spp. KL1	0,1	0,01±0,002	0,03±0,01	0,049±0,03	0,05±0,04	0,03±0,003	0,01±0,002
<i>Enterococcus</i> spp. Lb5	0,1	0,02±0,01	0,03±0,01	0,05±0,007	0,08±0,004	0,08±0,007	0,103±0,004
<i>Enterococcus</i> spp. Zb3	0,1	0,053±0,03	0,14±0,06	0,135±0,04	0,13±0,01	0,125±0,007	0,129±0,007

### 2.1.2. La résistance aux sels biliaires

Les résultats de la résistance des isolats d'*Enterococcus* spp. (KL1, Lb5 et Zb3) aux sels biliaires à 0,3% sont illustrés et détaillés dans la figure et le tableau suivant:



**Figure 09 :** Résultats de la résistance d'*Enterococcus* spp aux sels biliaires

Dans cet essai, les isolats testés ont révélé une croissance lente après 4 h d'incubation en présence des sels biliaires à 0,3%, suivis d'une chute importante et diminution rapide de la croissance des entérocoques après 8 d'incubation, surtout pour les isolats Zb3 et KL1. Cependant, tous les isolats ont montré une tolérance et une adaptation aux sels biliaires, puis ont commencé la croissance avec une augmentation rapide qu'après 12 d'incubation. Donc, on remarque que toutes les *Enterococcus* spp. testées montrent une résistance considérable aux sels biliaires durant le temps d'incubation où leur croissance se stabilise après 24 heures d'incubation. Notons que, l'isolat *Enterococcus* spp. Lb5 semble être la plus résistante aux sels biliaires, car sa croissance est plus rapide par rapport aux autres isolats testés. Elle atteint une valeur maximale de  $6,4 \times 10^8$  UFC/ml équivalent d'une DO<sub>600</sub> égale 0,8 seulement après 24 d'incubation. Alors que, l'isolat *Enterococcus* spp. Zb3 a montré une tolérance stable et remarquable aux sels biliaires durant 8 heures d'incubation suivi d'une croissance rapide après 12 heures d'incubation. Elle atteint sa valeur maximale de  $4,8 \times 10^8$  UFC/ml équivalent d'une DO<sub>600</sub> égale 0,6 après 24

d'incubation. Néanmoins, l'isolat K11 a montré une sensibilité considérable aux sels biliaries pendant 8 d'incubation, puis elle a commencé la croissance avec une légère augmentation qu'après 12 d'incubation. Elle atteint sa valeur maximale de  $4,3 \times 10^8$  UFC/ml équivalent d'une  $DO_{600}$  égale 0,54 après 24 d'incubation.

**Tableau03** : Résultats de la résistance d'*Enterococcus spp* aux sels biliaries.

	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
<i>Enterococcus spp.</i> K11	0.1	0.286±0.02	0.016±0.01	0.181±0.03	0.347±0.06	0.371±0.03	0.54±0.001
<i>Enterococcus spp.</i> Lb5	0.1	0.133±0.01	0.226±0.02	0.278±0.005	0.33±0.01	0.47±0.01	0.8±0.008
<i>Enterococcus spp.</i> Zb3	0.1	0.1±0.01	0.0775±0.003	0.203±0.05	0.365±0.05	0.5±0.01	0.6±0.01

## 2.2. Production des amines biogènes

Les résultats de production des amines biogènes sont rassemblés dans le tableau 4 et la figure 10. Après l'incubation des isolats d'*Enterococcus spp.* dans les deux milieux TDA et HDA à 37 °C pendant 24-48 h, un halo violet et un changement de couleur dans le milieu entourant les colonies a été observé pour l'isolat K11, ce qui indique une réaction positive de la production d'amines biogènes. Cependant, aucun halo violet n'a été observé sur les boîtes incubées pour les isolats Lb5 et Zb3, ce qui indique une réaction négative de la production d'amines biogènes dans les milieux HDA ou TDA. Notons que, un témoin positif a été utilisé dans cet essai représenté par la bactérie *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Tableau04** : Résultats de production des amines biogènes et de gélatinase

Isolats	Tyramine	Histidine	Gélatinase
<i>Enterococcus spp.</i> K11	+	+	+
<i>Enterococcus spp.</i> Lb5	-	-	-
<i>Enterococcus spp.</i> Zb3	-	-	+



(a) Production d'histamine en milieu HDA pour l'isolat KL1



(b) Réaction positive de production d'histamine pour la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853



(c) Production de tyramine en milieu TDA pour l'isolat KL1



(d) Réaction positive de production de tyramine pour la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853

**Figure 10** : Résultats de production des amines biogènes (histamine et tyramine).

### 2.3. Test de gélatinase

Les résultats de production de gélatinase sont présentés dans le tableau 4 et la figure 11. Après l'incubation des isolats d'*Enterococcus* spp. dans le milieu BHI agar (10 g/l de peptone et 30 g/l gélatine) à 37 °C pendant 24-48 h, puis refroidissement à 4 °C pendant 5 h, deux isolats KL1 et Zb3 ont dégradé la gélatine par la présence des zones de turbidité autour des colonies, ce qui indique une réaction positive d'hydrolyse de la gélatine. Cependant, aucune zone de turbidité autour des colonies n'a été détectée pour l'isolat Lb5, ce qui indique une réaction négative

d'hydrolyse de la gélatine. Dans cet essai, la bactérie *P. aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisée comme témoin positif.



Réaction positive d'hydrolyse de la gélatine (isolat Zb3)

Réaction positive d'hydrolyse de la gélatine (isolat K11)

Réaction positive d'hydrolyse de la gélatine (souche *P. aeruginosa* ATCC 27853)

**Figure 11:** Résultats de test de gélatinase d'*Enterococcus* spp.

#### 2.4. Pouvoir d'antibiorésistance

Les résultats de test d'antibiorésistance des isolats d'*Enterococcus* spp. (KL1, Lb5 et Zb3) sélectionnés pour cette étude sont rassemblés dans le tableau n°5 et la figure n° 12. La sensibilité des trois isolats a été évaluée sur milieu MHA agar, utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par la norme NCCLS (2004). Selon cette norme présenté dans le tableau 05, nos résultats montrent que tous les isolats d'*Enterococcus* spp. testées sont sensibles à la vancomycine et résistantes à l'ampicilline.

**Tableau 05:** Résultats d'antibiorésistance des isolats d'*Enterococcus spp*

Isolats	TE <sup>a</sup>	Amp	E	C	P	R	VA
<i>Enterococcus spp.</i> K11	R <sup>b</sup>	R	R	S	R	R	S
<i>Enterococcus spp.</i> Lb5	S	R	S	I	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i> Zb3	R	R	I	R	S	R	S
Résistante (R)	≤14 <sup>c</sup>	≤16	≤13	≤17	≤14	≤16	≤14
Intermédiaire (I)	15–18	–	14–22	18–20	–	17–19	15–16
Sensible (S)	≥19	≥17	≥23	≥21	≥15	≥20	≥17

<sup>a</sup> TE : Tétracycline 30 µg; Amp : Ampicilline, 10 µg; E : Erythromycine 15µg; C : Chloramphenicol 30 µg; P: Pénicilline G 10µg; R : Rifampicine 30 µg; VA : Vancomycine 30µg

<sup>b</sup> I : intermédiaire; S : sensible; R : résistant

<sup>c</sup> Les valeurs critiques sont exprimées en millimètre (mm) selon la norme NCCLS (2004)

Cependant, l'isolat K11 a montré une sensibilité au chloramphénicol et résistance aux autres antibiotiques, tandis que l'isolat *Enterococcus spp.* Lb5 a montré une réponse intermédiaire au chloramphénicol et une sensibilité aux autres antibiotiques. De plus, l'isolat Zb3 a présenté une réaction intermédiaire à l'érythromycine, mais résistance considérable aux autres antibiotiques, à l'exception de la pénicilline.



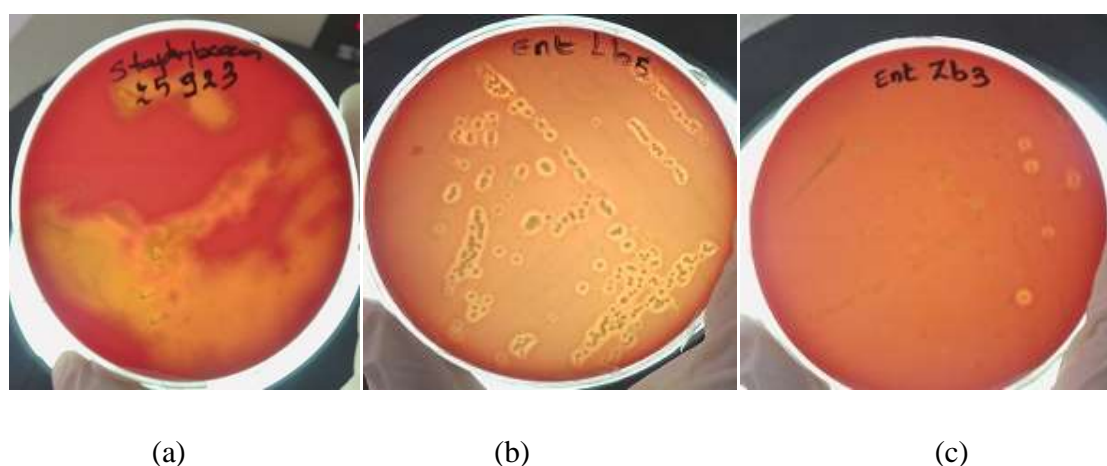
**Figure 12 :** Mesure des zones d'inhibition aux antibiotiques mesurées à l'aide de pied à coulisse

## 2. 5. Test d'hémolyse

Le tableau n°06 et la figure 13 montrent les résultats de l'activité hémolytique des isolats d'*Enterococcus* spp. sélectionnés pour cette étude. Cette activité hémolytique des isolats d'entérocoques (KL1, Lb5 et Zb3) a été mise en évidence par la gélose au sang additionnée du sang humain à 7% (v/v). À l'exception de l'isolat Lb5 qu'a montré une hémolyse de type  $\beta$ , aucune réaction hémolytique ( $\gamma$  hémolyse) n'a été détectée dans les autres entérocoques testés (KL1 et Zb3). Notons que, la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée dans cet essai comme un témoin de  $\beta$  hémolyse.

**Tableau 6:** Résultat de l'activité hémolytique des entérocoques sélectionnés pour cette étude

Isolats	Activité hémolytique
<i>Enterococcus</i> spp. KL1	$\gamma$
<i>Enterococcus</i> spp. Lb5	$\beta$
<i>Enterococcus</i> spp. Zb3	$\gamma$



**Figure 13 :** Activité hémolytique d'entérocoques

(a) *Staphylococcus aureus*  $\beta$  hémolyse; (b) EntLb5  $\beta$  hémolyse ; (c) Ent Zb3  $\gamma$  hémolyse.

## 2.6. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'effet inhibiteur des trois isolats d'*Enterococcus* spp. contre quatre souches de références : deux souches bactériennes pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et deux souches fongiques pathogènes (*Penicillium expansum* MUCL 29192, *Aspergillus parasiticus* CBS 100926), sont présentés dans le tableau et les figures ci-dessous.

L'activité antimicrobienne vis-à-vis les microorganismes pathogènes a été recherchés par la méthode de diffusion en puits sur gélose. Tous les surnageants d'*Enterococcus* spp. testés ont inhibé la croissance de *P. expansum*. avec des degrés variables selon les isolats. De plus les isolats ont montré une faible inhibition sur la croissance de *S. aureus*. L'isolat *Enterococcus* spp. Zb3 présente une forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits sur la croissance d'*A. parasiticus*, tandis qu'aucune inhibition a été exercée par cet isolat sur la croissance de *P. aeruginosa*. Par contre, le surnageant d'*Enterococcus* spp. Lb5 a montré une faible inhibition sur la croissance *A. parasiticus*, alors que *P. aeruginosa* a montré une résistance considérable à l'effet de cet surnageant. Cependant, l'isolat *Enterococcus* spp. K11 présente l'activité antimicrobienne la plus faible, car le surnageant de cet isolat n'a pas inhibé la croissance d'*A. parasiticus* et de *P. aeruginosa*.

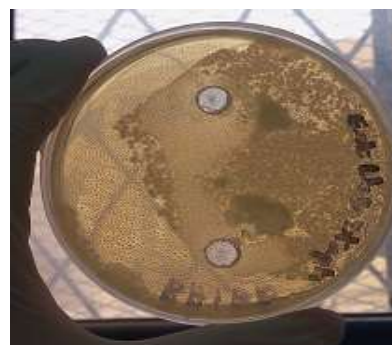
**Tableau 07** : Résultat de l'activité antimicrobienne des *Enterococcus* spp. sélectionnés pour cette étude.

Isolats	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. expansum</i> MUCL 29192	<i>A. parasiticus</i> CBS 100926
<i>Enterococcus</i> spp. K11	+	–	+	–
<i>Enterococcus</i> spp. Lb5	+	–	++	+
<i>Enterococcus</i> spp. Zb3	+	–	++	++

++, forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits; +, faible inhibition autour des puits; –, pas de zone d'inhibition



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figure 14 :** Activité antimicrobienne des entérocoques vis-à-vis (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;(b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;(c) *Aspergillus parasiticus* CBS 100926 ; (d) *Penicillium expansum* MUCL 29192

## *Discussion*

### 3. Discussion

Les entérocoques sont un vaste groupe de microorganismes, ubiquistes, qui peuvent être trouvés dans différentes niches y compris le tractus gastro-intestinal humain (Nueno et Narbad, 2011) et les produits alimentaires, en particulier les viandes et les produits laitiers fermentés (Gomes et al., 2008; Martín et al., 2009). Ce sont des cocci ovoïdes à Gram positif et catalase négative, disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules (Bouvet et Cowry, 1994).

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les pH acides. Des souches appartenant à d'autres espèces lactiques, y compris les entérocoques, ont été utilisées dans le passé en tant que probiotiques (Fuller, 1989 ; O'Sullivan et al., 1992 ; Holzapfel et al., 1998). Au cours des dernières décennies, un intérêt croissant en ce qui concerne l'utilisation des entérocoques ayant des propriétés technologiques et métaboliques souhaitables comme culture starter, culture adjuvante ou probiotiques a été soulevé, en raison de leur capacité à survivre et à rivaliser dans le tractus gastro-intestinal (Franz et al., 2011 ; Martín et al., 2009). Ce rôle bénéfique a conduit à l'inclusion des souches entérocoques dans certaines cultures starter (Parente et al., 1989, Centeno et al., 1999, Menendez et al., 2004). La capacité de survie à l'acidité gastrique varie beaucoup selon les genres et les souches de la même espèce. Dans la présente étude, les *Enterococcus* spp. testées montrent une sensibilité considérable au pH 4 durant le temps d'incubation où leur croissance se stabilise après 24 heures d'incubation en milieu acide seulement pour les deux isolats Zb3 et Lb5. Cependant, l'isolat K11 a affiché un temps de sensibilité remarquable au pH acide, puis une absence de croissance avec une mortalité bactérienne après 16 d'incubation. Giraffa (2003) a rapporté que la persistance des entérocoques pendant l'affinage du fromage peut être attribuée à leur grande tolérance aux différents stress, notamment au stress (entre pH 4,0 et 9,6).

La sécrétion gastrique constitue le premier mécanisme de défense contre la majorité des microorganismes ingérés. Un niveau de sel biliaire de 0,3% est considéré comme la concentration appropriée utilisée pour la sélection de souches résistantes et d'espèces probiotiques à usage humain (Pancheniak et Soccol, 2005). Tous les isolats testés dans cette étude ont montré une tolérance et une adaptation aux sels biliaires avec une croissance rapide après 12 d'incubation. Des résultats similaires ont été rapportés par Banwo et al., (2013), Pieniz et al., (2014), Yousef (2014) et Ispirili et al. (2015). La capacité des entérocoques à se développer en présence des sels

---

biliaires pourrait être liée à la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH) qui est une enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires (Begley et *al.*, 2006 ; Hamon et *al.*, 2011).

Parmi les aspects indésirables, entre autres, figurent la détérioration des aliments et la production d'amines biogènes (Foulquie et *al.*, 2006). La production d'amines biogènes semble être une activité défavorable des entérocoques dans les produits laitiers fermentés, car les amines biogènes ont été associées à un certain nombre d'épisodes d'intoxication alimentaire (Karovacova et Kohajdova, 2005). Les résultats de la présente étude montre l'absence de production d'histamine et de tyramine par les isolats d'entérocoques testés, à l'exception d'*Enterococcus* spp. K11. Cependant, certains auteurs ont également signalé la production des amines biogènes par les entérocoques. Il a été observé que la croissance des entérocoques dans le lait et les produits laitiers conduit à la formation de taux importants d'amines biogènes (Bhardwaj et *al.*, 2008). En effet, la tyramine est la seule amine biogénique produite par les entérocoques isolés à partir de produits laitiers (Bover et *al.*, 2001). Il est donc important de sélectionner des souches sûres, non productives d'amines biogènes, afin d'utiliser comme culture starter ou probiotiques.

La gélatinase est une métallo-endopeptidase extracellulaire impliquée dans l'hydrolyse de la gélatine, du collagène, de l'hémoglobine et d'autres peptides bioactifs (Su et *al.*, 1991). La production de gélatinase a augmenté la pathogénicité chez un modèle animal (Singh et *al.*, 1998), ce qui confirme son rôle dans la virulence. Dans la présente étude, deux isolats KL1 et Zb3 ont dégradé la gélatine, ce qui indique la présence de gélatinase. Cependant, aucune hydrolyse de gélatine n'a été détectée pour l'isolat Lb5, ce qui confirme l'absence de gélatinase, facteur de virulence, dans cet isolat. Ceci est en accord avec les résultats de Mannu et *al.* (2003), Franz et *al.* (2001) et Banwo et *al.* (2012).

La résistance fréquente des entérocoques aux antibiotiques couramment utilisés et le risque de transmission de gènes résistant aux antibiotiques sont particulièrement une préoccupation majeure pour une utilisation sans danger dans les aliments ou en tant qu'agents de lutte biologique (Giraffa, 2000). Dans la présente étude, nos résultats montrent que tous les isolats d'*Enterococcus* spp. testés sont sensibles à la vancomycine et résistantes à l'ampicilline. Une observation similaire a été rapportée par Abriouel et *al.* (2008) sur la résistance à l'ampicilline et à la pénicilline chez les *Enterococcus*, en particulier *E. faecium* et *E. faecalis*. De plus,

---

l'émergence des entérocoques résistants à la vancomycine est une préoccupation majeure de santé dans le monde. Elle est considérée comme l'antibiotique du dernier recours pour traiter les infections graves dues aux bactéries Gram positives résistantes, administrée exclusivement dans un environnement clinique, lorsque tous les autres antibiotiques échouent (Naoual et al., 2010). La résistance la plus répandue parmi les entérocoques isolés des produits laitiers dans la Littérature était également celle à la tétracycline qui a été détectée dans la présente étude pour les isolats *Enterococcus* spp. Zb3, KL1, à l'exception d'*Enterococcus* spp. Lb5. Ceci peut être attribué à l'utilisation répandue et excessive de cet antibiotique dans les pratiques vétérinaires (Pieniz et al., 2015). De manière générale, nos résultats ont montré une sensibilité élevée de tous les isolats aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine.

Il est important que les souches d'*Enterococcus*, en particulier celle présentant un potentiel d'application dans les aliments, doivent être vérifiées pour la présence d'hémolysine (Jack et al., 1995; Jett et al., 1994). Dans cette étude, aucune réaction hémolytique ( $\gamma$  hémolyse) n'a été détectée dans les entérocoques testés (KL1 et Zb3), à l'exception de l'isolat Lb5 qui a montré une hémolyse de type  $\beta$ . L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité (De Vuyst et al., 2003).

De nombreuses espèces d'*Enterococcus* produisent un grand nombre et diverses classes de peptides antimicrobiens utiles ou d'entérocoques (Foulquié Moreno et al., 2006). Les entérocoques sont un large groupe de bactériocines produites par des espèces d'entérocoques, qui ont montré une activité bactéricide contre les agents pathogènes bactériens et fongiques (Floriano et al., 1998; Enan et al., 2012). Dans la présente étude, tous les surnageants d'*Enterococcus* spp. testés ont inhibé la croissance de *P. expansum* avec des degrés variables selon les isolats. De plus les isolats ont montré une faible inhibition sur la croissance de *S. aureus*. Cependant, l'isolat *Enterococcus* spp. KL1 présente l'activité antimicrobienne la plus faible, car le surnageant de cet isolat n'a pas inhibé la croissance d'*A. parasiticus* et de *P. aeruginosa*. Plusieurs auteurs ont conclu que toute activité des entérocoques contre les bactéries à Gram négatif est très rare en raison de la couche de lipopolysaccharide dans leurs membranes externes (Belgacem et al., 2010; Torodov et Dicks, 2005). Des rapports antérieurs ont également prouvé que les entérocoques producteurs de bactériocines présentaient un effet inhibiteur puissant contre un large éventail de bactéries à Gram positif, notamment *Staphylococcus* (Belgacem et al., Hosseini

et al., 2009), ce qui concordent avec nos résultats. De plus, Fhoula et al., (2013) ont confirmé l'efficacité antifongique des souches d'*Enterococcus* contre la plupart des moisissures post-récolte testés (*A. niger*, *P. expansum* et *B. cinerea*) et ont mis en évidence leur utilisation potentielle en tant qu'agents de lutte biologique.

## *Conclusion*

Au cours des dernières décennies, un intérêt croissant en ce qui concerne l'utilisation des entérocoques ayant des propriétés technologiques et métaboliques souhaitables comme culture starter ou probiotiques a été soulevé. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail vise l'étude de pouvoir technologique de quelques isolats d'entérocoques isolés à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement. Les *Enterococcus* spp. testées dans la présente étude montrent une sensibilité considérable au pH 4 et une tolérance aux sels biliaries durant le temps d'incubation.

De plus, aucune production des amines biogènes (histamine et tyramine) n'a été détectée dans les isolats d'entérocoques testés, à l'exception d'*Enterococcus* spp. K11. Les deux isolats KL1 et Zb3 ont dégradé la gélatine, ce qui indique la présence de gélatinase. Cependant, aucune hydrolyse de gélatine n'a été détectée pour l'isolat Lb5. Le test d'antibiorésistance a montré également une sensibilité élevée de tous les isolats aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine. Dans cette étude, aucune réaction hémolytique ( $\gamma$  hémolyse) n'a été détectée dans les entérocoques testés (K11 et Zb3), à l'exception de l'isolat Lb5 qui a montré une hémolyse de type  $\beta$ .

D'autre part, l'étude de leur pouvoir antimicrobien a révélé que tous les surnageants d'*Enterococcus* spp. testés ont inhibé la croissance des quatre souches pathogènes testées avec des degrés variables selon les isolats. Cette activité inhibitrice pourrait être le résultat de l'activité de divers métabolites actifs tels que les entérocoques produites par les *Enterococcus*. Parmi les isolats d'entérocoques testés, un isolat (*Enterococcus* spp. Zb3) a été sélectionné pour des études plus approfondies en fonction de leurs aspects technologiques et sécuritaires.

Enfin, cette étude primaire nécessite d'être poursuivie par d'autres travaux complémentaires et qui peuvent être envisagées comme perspectives :

- Confirmer génotypiquement les différents isolats d'entérocoques testés,
- Identifier génotypiquement d'autres aspects sécuritaires tels que l'absence de facteurs de virulence, notamment le gène de production de gélatinase.
- Isoler et caractériser les composés antimicrobiens des entérocoques,
- Confirmer génotypiquement leur profil d'antibiorésistance.

## **Références bibliographiques**

A

- Abriouel H, Omar N B, Molinos A C, Lopez R L, Grande M J, Martínez Viedma P., et al. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1), 38-49.
- Aguilar-G, Robin Dubois-D, Jacqueline D, David C, et Philippe T. (2012). Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(1), 67-76.
- Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain, J., C, et Philippe T.(2010). Les entérocoques :avantageset inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Journal of Microbiological Methods*, 16(1), 89-105.
- Ammor M S, et Mayo B. (2007). Selection Criteria for Lactic Acid Bacteria to Be Used as Functional Starter Cultures in Dry Sausage Production: An Update. *Meat Science*, 76, 138-146.
- Andrewes FW, et Hordert T J. (1906). A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* ii, 708-13.
- Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swing J, et Dellaglio F.(2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*,68,303-316.
- Arizcum C, Barcina Y, et Torre P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from raw milk and Roncal and Idiazábal cheese. *Lait*, 77, 729-736.
- Aymerich T, Holo H, Håvarstein L, Hugas M, Garriga M, et Nes IF. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676-1682.

**B**

- Banwo K, Sanni A, et Tan H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 229-241.
- Batdorj B, Dalgarrondo M, Choiset Y, Pedroche J, Métro F, Prévost H et Chobert JM, Haertlé T . (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 837-848.
- Begley M, Hill C, Gahan CGM. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1729–1738.
- Belgacem Z, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martinez Canamero M, Galvez A et al. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21, 462-470.
- Belgacem ZB , Abriouel H , Omar NB , Lucas R , Martínez-Canamero M , Gálvez A , et Manaia M.(2009). Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21, 462–470.
- Bellomo G, Mangiagale A, Nicastro L. et Frigerio G. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics. *Current Therapeutic Research*, 28, 927-936.
- Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif N.M.K, Franz C M A P, Holzapfel WH, Perez Pulido R, Martinez Canamero M, et Galvez A.(2004). Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 118– 130.
- Bennik M , Vanloo B , Brasseur R , G.M. Gorris L , et Smid E. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1373, 47-58.

- Bhardwaj A, Malik R K, et Chauhan P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 317–325.
- Bouvet A, et Cowry G. (1994). Identification des entérocoques en microbiologie chimique. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 24 ,132-140.
- Bover Cid S, Hugas M, Izquierdo Pulido M, et Vidal Carou C M. (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 185–189.
- Burdychova R, et Komprda T. (2007). Biogenic amineforming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiological Letters*, 276, 149–155.

### C

- Casaus P, Nilsen T, Cintas L. M, Nes, I. F, Hernandez P., et Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143, 2287-2294.
- Centeno J A, Menendez S, Hermida M A, et Rodríguez Otero J L. (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 97– 111.
- Chen H, et Hoover D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- Chlebicki MP, et Kurup A. (2008). Vancomycin-resistant *Enterococcus* – A Review from a Singapore perspective. *ANNALS Academy of Medicine Singapore*, 37(10), 861-869.
- Chow J , Thal L A, Perri M B, Vazquez J A , Donabedian S M, Clewell D B, et Zervos M . (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 37(11), 2474-2477.
- Cintas L. M, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández P. E, et Nes I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321-4330.

- Cintas L M ., Casaus P, Holo H, Hernández P E, Nes I F, et Håvarstein L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180,1988-1994.
- Clewell DB. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in *Enterococci*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(2), 90-102.
- Collins J. K, Thornton G, et Sullivan G. O. (1998). Selection of probiotics strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.

## D

- Daoudi A. (2018). Isolement et identification des entérocoques à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement : Antibiorésistance, activité antimicrobienne et hémolytique. Mémoire de Master en Agroalimentaire et contrôle de qualité. Université Amar Telidji, Laghouat.
- De Kwaadsteniet M, Todorov S, Knoetze H. et Dicks L, (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram+ and Gram- bacteria. *International Journal of Food Microbiol*, 105, 433-444.
- De Vuyst L, Foulquie MR et Revets H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84,299–318.
- De Vuyst L, et Vandamme EJ. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics, and applications. London: Blackie Academic and Professional.
- Desai PJ, Pandit D, Mathur M, et Gogate A. (2001).Prevalence, identification and distribution of various species of *Enterococci* isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 19(3), 132- 137.
- Devriese L, Van De Kerckhove A, Kilpper-Bälz R. et Schleifer K. (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International journal of Systematic Bacteriology*, 37(3), 257-259.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, et Daly C. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria

of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386-392.

- Durlu-Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N, et Litopoulou Tzanetaki E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861–870.

### E

- Eaton T.J, et Gasson M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1628-1635.
- El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T et al. (2010). Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chemistry*, 120, 758-764.
- Enan G, Awny N, Abou Zeid A A, et Abdou M A. (2012). Incidence and virulence of *Bacillus cereus* isolated from Egyptian foods during four seasons. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 4816-4824.

### F

- Farrow JAE, Jones D, Phillips BA et al. (1983). Taxonomic studies on some group D streptococci. *Journal of general microbiology*, 129, 14232.
- Fernández Diaz M J. (1983). Olives. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production by Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 379-397
- Fhoula I, Najjari A, Turki Y, Jaballah S, Boudabous A, et Ouzari H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed Research International*, DOI : <http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708>
- Floriano B, Ruiz Barba JL, et Jiménez Diaz R.(1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid- encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4883–4890.

- Foulquié Moreno M R, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et de Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franz C M A P, Muschool Silberhorn A B, et Yousif N M K. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4385-4389.
- Franz C M, Stiles M E, Schleifer K H, et Holzapfel W H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88,105-122.
- Franz C.M, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, et Galvez A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 125–140.
- Franz C.M.A.P, Holzapfel W.H, et Stiles M.E.(1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1 –24.
- Franz CMAP, Schillinger U, et Holzapfel W H. (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 255– 270.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.

## G

- Garvie EI, et Farrow JAE. (1981). Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using Deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments* C2, 299-310.
- Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J et Cogan TM. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiol*, 71, 177–188.
- Giraffa G. (2007). *Enterococci and Dairy Products*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 85–97.
- Giraffa G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.

- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163–171.
- Giraffa G, Gatti M, Carminati D, et Neviani E. (1993). Biochemical and metabolic characteristics of strains belonging to *Enterococcus* genus isolated from dairy products. *Proceedings of the Congress Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality*. Naples, February, 23–24.
- Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, et De Martinis ECP.(2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology* ,25(5), 668-675.

## H

- Hadji-Sfaxi I, El-Ghaish S, Ahmadova A, Batdorj B, Le Blay G, Barbier G et al. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, 22, 2020-2027.
- Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude Werner D., et al. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11(63). doi: 10.1186/1471-2180-11-63
- Higashide T, Takahashi M, Kobayashi A, Ohkubo S, Sakurai M, Shirao Y, Tamura T, et Sugiyama K. (2005). Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(3), 1475-1476.
- Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, et Mikes Z. (2005). One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratislavské lekárske listy*, 106(2), 67-72.
- Holzapfel W H, Haberer P, Snel J, Schillinger U, et Huis in't Veld JHJ.(1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiol*, 41, 85–101.
- Hosseini SV, Arlindo S, Bohme K, Fernandez No C, Calo Mata P, et Barros Velazquez J. (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1392–1403.

- Hugas M, Garriga M, et Aymerich MT.(2003). Functionality of Enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223– 233.
- Huycke M, Spiegel C. et Gilmore M. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8), 1626-1634.
- Hyrominus B, Le Marrec P, Hadj Sassi A, et Deschamps A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 61, 193-197.

## I

- Ispirli H, Demirbas F, et Dertli E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(11), 861-870.
- Ispirli H, Demirbas F, et Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie - Food Science and Technology*, 75,358-365.

## J

- Jack RW, Tagg J, et Ray B. (1995).Bacteriocins of Grampositive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 171–200.
- Javed A, Masud T, ul Ain Q, Imran M, et Maqsood I. (2011). Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Annals of Microbiology*, 61(4), 699-708.
- Jett BD, Huycke MM, et Gilmore MS. (1994). Virulence of *Enterococci* . *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4) 462–478.
- Joosten H M L J, et Northolt M. D.(1989). Detection, growth and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2356–2359.
- Joyce M, Koenig J, Bliss M, et Mariscalco M. (2017). Normal and Abnormal Neutrophil Physiology in the Newborn. *Fetal and Neonatal Physiology fifth edition*, 2, 1216-1229.

**K**

- Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, Simmons BP, Melton K et al. (2007). Response to Emerging Infection Leading to Outbreak of Linezolid Resistant *Enterococci*. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (7).
- Karovičová J. et Kohajdová Z.( 2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59(1), 70-79.
- Kayser F. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiol*, 88, 255-262.
- Kilpper Bälz R, Fischer G, Schleifer KH. (1982). Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Current Microbiology*, 7, 245-50.

**L**

- LeBlanc D. (2006). *Enterococcus*. *Prokaryotes*, 4, 175-204.
- Leclerc H, Devriese L, et Mossel D. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 81, 459-466.
- Leroy F, et De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–78.
- Leroy F, Foulquié Moreno M R, et De Vuyst L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 235-240.
- Leuschner R. G. K, Kurihara R, et Hammes W. P.(1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1141-1144.
- Lewis CM, et Zervos MJ. (1990). Clinical manifestation of entéroccocal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9, 111-7.
- Ludwig W, Seewaldt E, et Kilpper-Bälz R. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of general microbiology*, 131, 543-51.

M

- Magnusson J, et Schnurer J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5
- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechib LA. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 291–304.
- Marcinek H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A; Gauer M. (1998). *Enterococcus faecalis* Gene Transfer under Natural Conditions in Municipal Sewage Water Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 626-632.
- Martín Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, et Martínez Bueno M. (2009). Characterization and safety evaluation of Enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132,24-32.
- McCabe Sellers B, Staggs C, et Bogle M. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 58-65.
- Menendez S, Godinez R, Hermida M, Centeno JA, & Rodriguez Otero JL. (2004). Characteristics of “Tetilla” pasteurised milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, 21,97-104.
- Mercenier A, Pavan S, et Pot B. (2003). Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 175-191.
- Morea M, Baruzzi F, Cocconcell PS.(1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 574– 582.
- Mundy LM, Sahm DF et Gilmore M.(2000). Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 513-522.
- Murray B.E. (1990). The life and time of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology*, 3, 46-65.

N

- Naoual J, Abdelaziz B, Roberta C, Daga E, et Bouksaim M. (2010). Characterization of Enterococci isolated from Moroccan dairy products. *African Journal of Microbiology Research*, 4,1768-1774
- NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2004). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement, M31-S1. Vol. 24, No. 17, NCCLS: Wayne, Pennsylvania, USA.
- Nes I, Dzung B D, Håvarstein, LS, et Brurberg, M B. (1996). Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.
- Nueno Palop C, et Narbad A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2e3), 390-394.

O

- O'Sullivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, et Collins JK. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology*, 3, 309– 314.
- Ouwehand A C, Salminen S, et Isolauri E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.

P

- Pancheniak EDFR, et Soccol CR. (2005). Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* for swine. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 23, 299-310.
- Parente E, Villani F, Coppola R, et Coppola S. (1989). A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait*, 69, 271– 279.
- Pieniz S, Martinde Moura T, Paula VazCassenego A, Andrezza R, Paula GuedesFrazzon A, Anastácio de OliveiraCamargo F, et Brandelli A. (2015). Evaluation

of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51, 49-54.

- Pieniz S, Andreatza R, Anghinoni T, Camargo F, et Brandelli A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251-256.
- Pinto B, Pierotti R, Canale G, et Reali D. (1999). Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 258-263.
- Psoni L, Kotzamanides C, Andrighetto C, Lombardi A, Tzanetakis N, et Litopoulou-Tzanetaki E. (2006). Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 109-120.

### R

- Renye J A J, Somkuti G A, Vallejo Cordoba B, Van Hekken DL, et Gonzalez Cordova A F. (2008). Characterization of the microflora isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety*, 28, 59-75.
- Ruiz L, Margolles A, et Sanchez B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4(396). doi: 10.3389/fmicb. 2013.00396.

### S

- Sarantinopoulous P, Andrighetto C, Georgalaki M.D, Rea M C, Lombardi A, Cogan T M, Kalantzopoulos G, et Tsakalidou E. (2001). Biochemical properties of *Enterococci* relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11, 621-647.
- Schleifer KH et Kilpper Balz R.(1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: A Review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10(1), 1-19.
- Schleifer KH et Kilpper Balz R. (1984).Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis*

comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International journal of systematic bacteriology, 34(1), 31-34.

- Shalaby AR. (1999). Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. Food Chemistry, 65, 117–121.
- Singh K V, Qin X, Weinstock GM, et Murray B E. (1998). Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. The Journal of Infectious Diseases, 178(5), 1416- 1420.
- Sreeja S, Sreenivasa Babu PR, et Prathab AG. (2012). The prevalence and the characterization of the *Enterococcus* species from various clinical samples in a tertiary care hospital. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 6(9), 1486-1488.
- Su Y. A, Sulavik M. C, He P, Makinen K. K, Makinen P. L, Fiedler S, Wirth R, et Clewell DB .(1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. liquefaciens. Infection and Immunity, 59(1), 415–420.
- Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME, Andrighetto C, et Lanorte MT. (2000). A survey of the Enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto Caprino). Journal of Applied Microbiology, 89, 267–274.

#### T

- Todorov S. D, Wachsman M, Tomé E, Dousset X, Destro M. T, Milner L et al. (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. Food Microbiology, 27, 869-879.

#### U

- Upadhyaya PMG, Ravikumar KL et Umapathy BL.(2009). Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. Indian Journal of Medical Microbiology, 27(4), 301-305.

#### V

- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Moreno MRF, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, et Holzapfel WH. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their

correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1381-1391.

### W

- Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, et al. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* gelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *Journal of Bacteriology*, 185, 3613–3623.

### Y

- Yoon M Y, Kim Y J, et Hwang H J. (2008). Properties and safety aspect *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 925-933.
- Yousef N , Norhafizah A , Babak H , Dayang R , Rozita R , et Ahmad Yari K .(2014). Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora, *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1044-1051.

### Z

- Zendo T ,Eungruttanagorn N, Fujioka S, Yukihiro Tashiro, Nomura K, Sera Y, Kobayashi G, Jiro Nakayama, Ishizaki A, et Sonomoto K. ( 2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1181-1190.

**ملخص:** الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو دراسة الفعالية التكنولوجية لثلاث عزلات من المكورات المعوية (Zb3 و KL1 و Lb5) المعزولة من منتجات الحليب المخمر تقليديًا. أظهرت دراسات الحموضة ومقاومة العصارة الصفراء ان العزلات التي تم اختبارها حساسة لمعدل الحموضة 4 ولها قابلية للتكيف مع أملاح الصفراء خلال فترة الاختبار. بالإضافة إلى ذلك ، لم يتم اكتشاف أي إنتاج للأمينات الحيوية (الهستامين وتيرامين) في عزلات المكورات المعوية التي تم اختبارها ، باستثناء *Enterococcus* spp. KL1. كلا من العزلتين KL1 و Zb3 قامتا بتحليل الجلاتين وهذا دليل على وجود انزيم الجيلاتين ، ومع ذلك لم يتم الكشف عن التحلل للجيلاتين لعزل Lb5. كما أظهر اختبار مقاومة مضادات الميكروبات حساسية عالية لجميع العزلات للمضادات الحيوية التي تم اختبارها ، وخاصة الفانكوميسين. في هذه الدراسة ، لم يتم اكتشاف أي تفاعل للدم (انحلال الدم) في المكورات المعوية (K11 و Zb3) ، باستثناء العزلة Lb5 الذي أظهر انحلال الدم من النوع β. من ناحية أخرى ، كشفت دراسة قوتها المضادة للميكروبات أن جميع العزلات *Enterococcus* spp. حالت دون نمو السلالات المسببة للأمراض الأربعة بدرجات متفاوتة. بناءً على هذه النتائج، تم اختيار (*Enterococcus* spp. Zb3) لمزيد من الدراسة المعمقة بناءً على جوانب سلامتهم قبل استخدام هذه البكتيريا و/أو خلاصاتها في الاغذية.

**كلمات مفتاحية:** المكورات المعوية ، الكفاءة التكنولوجية ، الامن الصحي ، نشاط مضادات الميكروبات .

**Memory title: the study of technological properties of some strains of *Enterococcus* spp from food origin.**

**Name :** Bensaada **First name :** Rihab **Directed by :** Dr. Houicher Abderrahmane

**Abstract :** The main objective of this paper is to evaluate the technological properties of three isolates of *Enterococcus* (Lb5, KL1 and Zb3) from traditionally fermented milk products. The results of the acidity and the bile salts resistance showed a considerable susceptibility of these isolates to pH 4 and tolerance of bile salts during the incubation time. In addition, no production of biogenic amines (histamine and tyramine) was detected in the enterococcal isolates tested, with the exception of *Enterococcus* spp. K11. Both isolates KL1 and Zb3 hydrolyzed gelatin, indicating the presence of gelatinase. However, no hydrolysis of gelatin was detected for the isolate Lb5. The antibiotic resistance test also showed a high sensitivity of all isolates to the antibiotics tested, especially vancomycin. In this study, no haemolytic reaction ( $\gamma$  haemolysis) was detected in the enterococci tested (K11 and Zb3), with the exception of the Lb5 isolate that showed  $\beta$  hemolysis. On the other hand, the study of their antimicrobial activities revealed that all supernatants of *Enterococcus* spp. inhibited the growth of the four pathogenic strains tested with varying degrees depending on the isolates. Based on these results, one isolate (*Enterococcus* spp.Zb3) was selected for further investigation based on their safety aspects prior to the use of this bacterium and/or its extract in the food matrices.

**Key words:** *Enterococcus*, Technological aptitude, Safe aspect, Antimicrobial activity

**Titre du mémoire : Etude de pouvoir technologique de quelques isolats d'*Enterococcus* spp.d'origine alimentaire**

**Nom:** Bensaada **Prénom:** Rihab **Encadreur:** Dr. Houicher Abderrahmane

**Résumé :** Le présent travail a pour objectif principal d'étudier le pouvoir technologique de trois isolats d'*Enterococcus* (Lb5, KL1 et Zb3) isolés à partir des produits laitier fermentés traditionnellement. L'étude de la résistance à l'acidité et aux sels biliaires montre une sensibilité considérable de ces isolats au pH 4 et une tolérance aux sels biliaires durant le temps d'incubation. De plus, aucune production d'amines biogènes (histamine et tyramine) n'a été détectée dans les isolats d'entérocoques testés, à l'exception d'*Enterococcus* spp. K11. Les deux isolats KL1 et Zb3 ont dégradé la gélatine, ce qui indique la présence de gélatinase. Cependant, aucune hydrolyse de gélatine n'a été détectée pour l'isolat Lb5. Le test d'antibiorésistance a montré également une sensibilité élevée de tous les isolats aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine. Dans cette étude, aucune réaction hémolytique ( $\gamma$  hémolyse) n'a été détectée dans les entérocoques testés (K11 et Zb3), à l'exception de l'isolat Lb5 qu'a montré une hémolyse de type  $\beta$ . D'autre part, l'étude de leur pouvoir antimicrobien a révélé que tous les surnageants d'*Enterococcus* spp. testés ont inhibé la croissance des quatre souches pathogènes testées avec des degrés variables selon les isolats. Sur la base de ces résultats, un isolat (*Enterococcus* spp. Zb3) a été sélectionné pour des études plus approfondies en fonction de leurs aspects sécuritaires avant l'utilisation de cette bactérie et/ou leur extrait dans les matrices alimentaires.

**Mots clés :** Entérocoque, Aptitude technologique, Aspect sécuritaire, Activité antimicrobienne