



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 : DAOUDI Ayat Fatima Zohra

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

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

Isolement et identification préliminaire des Entérocoques à partir de produits laitiers fermentés traditionnels : Antibiorésistance, activité antimicrobienne et hémolytique

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mm Zamoum Miyada	MCA	Président
Mme Lounici Safia	MAA	Examineur
Mr. Houicher Abderrahmane	MCA	Rapporteur

Promotion : Juin – 2018

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: داودي آيات فاطمة الزهرة

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

عزل وتحديد تمهيديا المكورات المعوية من منتجات الألبان المخمرة
تقليدي: مقاومة الهضادات الحيوية، النشاط المضاد للميكروبات والنشاط
الدموي

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيدة زعموم ميادة	أستاذة محاضر "أ"	رئيسا
السيدة لونيسي صافية	استاذة مساعدة "أ"	ممتحن
السيد . هويشر عبد الرحمن	أستاذ محاضر "أ"	مقررا

الدفعة: جوان -2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

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

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé **SOHBI Omar** et sa famille surtout **Omi CHORFI Louiza** et bien sur A mon frère **Mihoube** et mes sœurs **Zoubida, Mebarka et Hayat***

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnait durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude,
Manal, Iman, Wissem, sabrina, wahiba et chikha.*

*A mon cher oncle **Ahmed** et sa femme et leurs enfants **Taher, Habib, Mebarka** et la belle **Amina***

*A toute ma famille : **DAOUDI, MILOUDI et SOHBI***

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci



Remerciement

*On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté
d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Je tiens avant tout à exprimer ma reconnaissance à **Mr. HOUICHER Abderrahmane**
pour avoir accepté de m'encadrer dans cette étude. Je le remercie pour la qualité de
son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant
notre préparation de ce mémoire.*

*Je suis consciente de l'honneur que nous a fait **Mme ZAMOUM Miyada** en étant
président du jury et **Mme LOUNICI Safia** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie ma famille pour son soutien. Merci à ma mère, mon père, mon fiancé,
mes sœurs, mon frère et mes amis.*

*je remercie également tous mes professeurs pour leurs générosités et la grande
patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et
professionnelles.*

*je remercie également tous les membres des laboratoires pédagogiques de l'université
d'Amar Thelidji-Laghout, qui j'ai bien aidés pour réaliser mon étude dans des
bonnes conditions.*

*A toute la promotion master II 2017-2018 /Option Agroalimentaire et contrôle de
qualité du Département des sciences Agronomique, Faculté des Sciences de la Nature
et de la Vie, Université Amar Thelidji-Laghout*



DAOUDI Ayat Fatima Zohra

Thème : Isolement et identification préliminaire des entérocoques à partir de produits laitiers fermentés traditionnels : Antibiorésistance ; activité antimicrobienne et hémolytique.

Résumé

La présente étude a pour objectif d'isoler et d'identifier préliminairement phénotypiquement des souches d'entérocoques à partir des quelques produits laitiers fermentés traditionnels (Lben, Jben, Smen, Klila et Zebda) afin d'évaluer leurs aspects sécuritaires par l'étude de l'antibiorésistance, de l'activité antimicrobienne et hémolytique. Cette étude nous a permis d'identifier 26 isolats dont *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* représentent 58% et 19% du total des bactéries isolées, respectivement. Les résultats du test d'antibiorésistance ont montré une grande sensibilité de toutes les souches d'entérocoques isolées aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine qui est considérée comme un problème de santé majeur dans le monde entier. De plus, aucune réaction hémolytique (γ hémolyse) n'a été détectée dans les 26 souches sélectionnées pour cette étude. L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité. Sur les 26 souches d'entérocoques identifiées, 2 souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antimicrobienne. Les résultats montrent que les surnageants d'entérocoques testés ont inhibé totalement la croissance de *Penicillium expansum*, tandis qu'une faible inhibition a été observée sur la croissance des *Staphylococcus aureus* et *Fusarium graminearum*. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus parasiticus* ont montré une résistance considérable envers les surnageants d'entérocoques testés. Enfin, cette étude suggère l'évaluation du pouvoir technologique des entérocoques isolés avant l'utilisation de ces bactéries et/ou leurs extraits dans les matrices alimentaires.

Mots clés : *Enterococcus*, Produit laitier fermenté traditionnel, antibiorésistance, activité hémolytique, activité antimicrobienne, Laghouat

داودي آيات فاطمة الزهراء.

الموضوع: عزل وتحديد تمهيديا المكورات المعوية من بعض منتجات الألبان المخمرة تقليديا: مقاومة المضادات الحيوية, النشاط المضاد للميكروبات والنشاط الانحلالي الدموي .

تلخيص

الغرض من هذه الدراسة هو عزل و تحديد تمهيديا السلالات المعوية للمكورات المعوية من خلال بعض منتجات الحليب المخمرة تقليديا (السمن, اللبن, الجبن, الزبدة و الكلية) لتقييم جوانب السلامة من خلال دراسة مقاومة المضادات الحيوية , والنشاط المضاد للميكروبات والنشاط الانحلالي الدموي. حددت هذه الدراسة 26 عزلة حيث *Enterococcus faecium* و *E. faecalis* مثلت 58 % و 19 % من مجموع البكتيريا المعزولة , على التوالي. أظهرت نتائج اختبار مقاومة مضادات الميكروبات حساسية عالية لجميع سلالات المكورات المعوية المعزولة للمضادات الحيوية المختبرة , لا سيما vancomycine الذي يعتبر مشكلة صحية رئيسية في جميع أنحاء العالم. بالإضافة إلى ذلك , لم يكتشف أي تفاعل انحلاي (انحلال دموي γ) في السلالات الـ 26 المختارة لهذه الدراسة. يعتبر عدم وجود نشاط انحلاي في المكورات المعوية معياراً مهماً لاختيار السلامة. من 26 سلالة للمكورات المعوية التي تم تحديدها , تم اختيار سلالتين لدراسة النشاط المضاد للميكروبات. وأظهرت النتائج أن مستخلصات المكورات المعوية المجربة تثبتت نهائيا نمو *Penicillium expansum* , في حين لوحظ وجود ضعف تثبيط على نمو *Staphylococcus aureus* et *Fusarium graminearum* . أظهرت *E. coli* , *Pseudomonas aeruginosa* و *Aspergillus parasiticus* مقاومة كبيرة للمكورات المعوية المختبرة. وأخيرا , تقترح هذه الدراسة تقييم القدرة التكنولوجية للمكورات المعوية المعزولة قبل استخدام هذه البكتيريا أو مستخلصاتها في المواد الغذائية.

الكلمات الدالة: المكورات المعوية, منتجات الألبان المخمرة تقليديا, مقاومة المضادات الحيوية, النشاط الانحلالي الدموي , النشاط المضاد للبكتيريا, الأغواط.

DAOUDI Ayat Fatima Zohra

Theme: Isolation and identification preliminary of enterococci from some traditional fermented milk products: Antibiotic resistance; antimicrobial and hemolytic activity.

Abstract

The purpose of this study is to isolate and identify preliminary, phenotypically the *Enterococcus* strains from some traditional fermented milk products (Lben, Jben, Smen, Klila and Zebda) in order to assess their safety aspects through the study of antibiotic resistance, antimicrobial and hemolytic activity. This study identified 26 isolates including *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* accounting for 58% and 19% of total isolated bacteria, respectively. The antimicrobial resistance test results showed a high sensitivity of all isolated to the tested antibiotics, particularly vancomycin which is considered a major health problem worldwide. In addition, no hemolytic reaction (hemolysis γ) was detected in the 26 strains selected for this study. The absence of hemolytic activity in enterococci should be considered as an important selection criterion for their safety. Two out of 26 enterococcal strains were selected for the study of antimicrobial activity. The results show that supernatants of tested enterococci were completely inhibited the growth of *Penicillium expansum*, whereas a weak inhibition was observed on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Fusarium graminearum*. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus parasiticus* showed considerable resistance to the tested enterococci supernatants. Finally, this study suggests the evaluation of the technological potency of isolated enterococci before the use of these bacteria and/or their extracts in food matrices.

Key words: *Enterococcus*, Traditional fermented milk product, Antibiotic resistance, Hemolytic activity, Antimicrobial activity, Laghouat.

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01 :	Schéma représente les méthodes de fabrication de principaux produits laitiers traditionnels en Algérie	09
Figure 02 :	<i>Entérocooccus faecalis</i>	17
Figure 03 :	Localisation des trois régions où les échantillons des produits laitiers sont provenus	20
Figure 04 :	Présentation des résultats des galeries API 20 strep	26
Figure 05 :	Présentation des résultats de teste hémolyse KL5 et KL6 (γ hémolytique)	31
Figure 06 :	Activités antibactériennes des souches d'entérocoque vis-à-vis ; (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Staphylococcus aureus</i> , (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	34
Figure 07 :	Activités antifongiques des souches d'entérocoque vis-à-vis ; (A) <i>Aspergillus parasiticus</i> , (B) <i>Penicillium expansum</i> , (C) <i>Fusarium graminearum</i> .	34

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01 :	La composition de lait de vache	04
Tableau 02 :	Plantes locales d'Algérie utilisées pour la coagulation du lait	06
Tableau 03 :	Valeurs moyenne des paramètres chimiques (g/100 g) des principaux produits laitiers traditionnels en Alger	12
Tableau 04 :	Les groupes de genre <i>Enterococcus</i> selon l'analyse de l'ARNr 16S	14
Tableau 05 :	Classification des entérocoques	19
Tableau 06 :	Résultats de l'étude morphologique et biochimique des isolats d'entérocoques	27
Tableau 07 :	Résultat du test antibiorésistance des entérocoques isolés à partir des produits laitiers fermentés traditionnels	29
Tableau 08 :	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Enterococcus</i> spp.	30
Tableau 9 :	Résultat de l'activité hémolytique des entérocoques isolés à partir des produits laitiers fermentés traditionnels	32
Tableau 10 :	Résultat de test d'activité antimicrobienne des entérocoques sélectionnés pour cette étude	33

Liste des abréviations

ADH	: Arginine d'hydrolase
API	: Analytical profile index
ATCC	: American Type Culture Collection
BCCM	: Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
CBS	: Culture collection of micro-organisms
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DLC	: Date limite de consommation
DO	: Densité Optique
ESC	: Esculine (citrates de fer)
FAO	: Food and Agriculture Organization
GLYG	: Glycogène
HfE	: L'eau du lait Forment Emulsion
HIP	: Hippurique
LAP	: Leucine aminopeptidase
MHA	: Mueller-Hinton agar
MUCL	: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain
OMS	: Organisation Mondiale de la santé
PDA	: Potato Dextrose Agar
PYRA	: Pyrolidonyl arylamidase
RIB	: Ribose
UFC	: Unité Formant Colonies
UV/VIS	: Ultraviolet/Visible
VP	: Production d'acétoïne
αGAL	: α -galactosidase
αGUR	: α -glucuronidase
βGAL	: β - galactosidase
βPAL	: β - glucuronidase

Tables des Matières

Table des matières

Résume	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre I. Généralités	03
I.1. Définition du lait	03
I.2. Compositions du lait	03
I.3. Les enzymes coagulant le lait	05
I.3.1. Enzymes d'origine animales	05
I.3.2. Les enzymes d'origine végétales	05
I.3.3. Les enzymes d'origine microbiennes	06
Chapitre II. Produits laitiers fermentés traditionnels	08
II.1. Fermentation traditionnelle du lait	08
II.2. Jben	10
II.3. Lben	10
II.4. Klila	10
II.5. Smen	10
II.6. Zebda	11
II.7. Composition des quelques produits laitiers fermentés traditionnels	12
Chapitre III. Les Entérocoques	13
III.1. Taxonomie	13
III.2. Caractéristiques générales	14
III.3. Habitat	15
III.5. Applications biotechnologiques des entérocoques	17
III.5.1. Les entérocoques (bactériocines des entérocoques)	18
III.5.2. Classification des entérocoques	18

Partie Expérimentale

Chapitre I. Matériel et Méthodes	20
I.1. Échantillonnage	20
I.2. Isolement des entérocoques	21
I.2.1. Conservation des isolats	21
I.3. Caractéristiques phénotypiques des souches	21
I.3.1. Etude morphologique	21
I.3.2. Etude biochimique	22
I.4. Test d'antibiorésistance	23
I.5. Etude de l'activité hémolytique	23
I.6. Activité antimicrobienne	24
I.6.1. Préparation des surnageants bactériens d'entérocoques	24
I.6.2. Préparation des suspensions bactériennes	24
I.6.3. Préparation des suspensions fongiques	24
I.6.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne	25
Chapitre II. Résultats et discussion	26
II.1. Etude morphologique et biochimique	26
II.2. Antibiorésistance	28
II.3. Activité hémolytique	31
II.4. Recherche de l'activité antimicrobienne	33
Conclusion	35
Références Bibliographiques	37
Annexes	47

Introduction

Introduction

Les pays d'Afrique du Nord partagent de nombreux aliments traditionnels résultant du mélange des habitudes alimentaires apportées par ces civilisations et leurs interactions avec ceux des habitants d'origine tels que les gens d'amazigh / berbère au Maghreb. Les variétés de produits laitiers séculaires, le plus populaire d'entre eux jben, lben et smen, sont connues et encore très appréciées par les consommateurs de ces pays (Benkerroum et Tamime, 2004, Abd-El Salam et Benkerroum, 2006).

L'Algérie dispose de traditions avérées de fabrication des produits laitiers même si l'activité est limitée à la sphère domestique. Ces produits laitiers traditionnels sont le produit historique du dynamisme social et économique des communautés rurales féminines (Hadj Aissa, 2011). De nos jours, les aliments de fabrication traditionnelle sont toujours appréciés par quelques consommateurs. L'excès d'aliments et la nécessité de les consommer pour survivre pendant l'hiver et les périodes de sécheresse menèrent l'homme à utiliser depuis longtemps et empiriquement des procédés de conservation. Ces aliments transformés par nos ancêtres sont à l'origine des produits des industries alimentaires actuelles. La fermentation avec les procédés de séchage et de salage, est la plus ancienne des méthodes de conservation des aliments, elle est ancrée dans les cultures traditionnelles et la vie des villageois (Marshall et Meijia, 2012).

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). Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, ainsi que dans une large variété de produits alimentaires, en particulier les produits laitiers (Fouliqué et *al.*, 2006). Ils sont utilisés dans les aliments soit comme agents antimicrobiens, soit pour leurs propriétés organoleptiques et parfois comme probiotiques. 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 (Chen et *al.*, 2003).

Du fait de la place importante qu'occupent les entérocoques dans la fermentation et la production des produits laitiers, la présente étude a pour objectif d'isoler et d'identifier phénotypiquement et biochimique des souches d'entérocoques à partir des produits laitiers fermentés traditionnels afin d'évaluer leur aspects sécuritaires par l'étude de l'antibiorésistance, de l'activité antimicrobienne et hémolytique.

Le présent travail s'articule comme suit: le premier chapitre s'intéresse à une synthèse bibliographique sur les produits laitiers fermentés traditionnels et les entérocoques. Le second chapitre traite le matériel et les méthodes utilisés pour l'isolement et l'identification des Entérocoque ainsi que l'évaluation des aspects sécuritaires des souches sélectionnées pour cette étude. Le troisième chapitre discute les résultats obtenus, enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Partie
Bibliographique

Chapitre I. Généralités

I.1. Définition du lait

Le *Codex Alimentarius* (1999), le lait a défini comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Selon Deforges et *al.* (1999), le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes.

I.2. Compositions du lait

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion. Le tableau 01 montre la composition approximative et l'état physicochimique de chacun des constituants solides majeurs du lait.

- Une solution vraie est un mélange de substances liquides ou solides solubilisées, appelées solutés, dans un solvant liquide.
- Une suspension colloïdale est un mélange constitué d'une phase dispersée solide non solubilisée, présente sous forme de très fines particules solides dans une phase dispersante liquide (S\L): quand les particules ont beaucoup d'affinité pour la phase aqueuse, on nomme ce système une solution colloïdale.
- Une émulsion consiste en un mélange d'une phase dispersée liquide non solubilisée, présente sous forme de très fines gouttelettes, dans une phase dispersante liquide; on peut donc avoir une émulsion huile dans l'eau (H/E) ou une émulsion eau dans l'huile (E/H) les matières grasses et l'eau du lait forment une émulsion HfE, tandis que l'eau et les matières grasses du beurre forment une émulsion E/H (Carole et Vignola, 2002).

Tableau N°1: La composition de lait de vache (Carole. Vignola, 2002).

Eléments	Composition (g /l)	Etat physique de composants
Eau	905	Eau libre (solvant) +eau liée : 3.7%
Glucide : lactose	49	Solution
Lipides:	35	Emulsion de globules gras
-Matière grasse proprement dite.	34	(3 à 5 μ m)
-Lécithine (phospholipides).	0.5	
-partie insaponifiable (stérols, carotènes, tocophérols)	0.5	
Protides:	34	-Suspension méculaire de
-Caséines.	27	phospho-caseinate de
-protides solubles (globuline, albumine).	5.5	calcium (0.08 à 0.12 μ m).
-substances azotées non protéique.	1.5	-Solution colloïdale.
Sels:	9	-Solution ou état
-Acide citrique.	2	colloïdale.
-Acide phosphorique.	2.6	
-Acide chlorhydrique.	1.7	
Constituants divers: (Vitamines, Enzymes gaz dissous).	Traces	
Extrait sec total.	127	
Extrait sec non gras.	92	

I.3. les enzymes coagulant le lait

Ils existent plusieurs types des enzymes protéolytiques ayant la propriété de coaguler le lait ; on à des enzymes d'origine animale, végétale ou microbienne (Boufeldja, 2017).

I.3.1. Enzymes d'origine animales

- **Présure :**

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait (Alais, 1984 ; Wigley, 1996). De moindres quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau, la dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la troisième poche de l'estomac appelée abomasum ou caillette. Elle renferme deux enzymes actives :

a)- La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale (Ramet, 1997). Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique. Elle subit alors une conversion en chymosine active (Boufeldja, 2017).

b)- La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage (Ramet, 1997), A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. D'après Broome et Hickey (1990), 20% de l'activité coagulante est assurée par la pepsine dans la fabrication fromagère (Cheddar, Emmental,...) (Boufeldja, 2017).

I.3.2. Les enzymes d'origine végétales

Les préparations coagulantes provenant du règne végétale sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures, tel que le gaillet, l'artichaut, la cardon qui ont été et ou sont encore utilisés dans des fabrications de fromages fermiers, ainsi que le latex du figuier. Des études récentes ont été réalisées par différents auteurs, qui approuvent quelques avantages aux protéases extraites des végétaux (Tableau 02). Ces dernières, sont plus stables à la chaleur par rapport aux protéases d'origine microbienne et animale (Talantikite-Kellil, 2015).

Tableau 02:Plantes locales d'Algérie utilisées pour la coagulation du lait (Talantikite-Kellil, 2015).

Nom scientifique	Nom commun		
	Français	Anglais	Algérien
<i>Cynara scolymus</i> L.	Artichaut	Artichocke	Karnoune
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Cardon	Cardoon	Thaga/ khorchef
<i>Seneciojacobaea</i> L.	Séneçon	Ragwort	Debouz-el-arabe
<i>Ficus carica</i> L.	Figuier	Figtree	Kerma

I.3.3. Les enzymes d'origine microbiennes

En pratique, l'utilisation des préparations enzymatiques microbiennes a été soumise à une stricte réglementation, imposant des contrôles hygiéniques (liés à leur production et extraction) et toxicologiques sévères, afin d'éviter tout risque de toxicité lié à la présence d'antibiotiques et/ou d'aflatoxines (Noor-Devilliet et al., 1983). Ces coagulants peuvent être facilement produits par fermentation (Boufeldja, 2017).

Toutefois, ils montrent une forte activité protéolytique pendant la fabrication du fromage, ce qui peut entraîner une perte de protéine, un rendement plus faible, et la génération de saveur désagréable (Harboe et al., 2010).

On distingue deux catégories de protéases microbiennes : les succédanés d'origine bactérienne et les succédanés d'origine fongique (Boufeldja, 2017).

- **D'origine bactérienne**

Depuis une quarantaine d'années, une puissante industrie de transformations s'est développée dans le monde. Elle produit des substances variées dont une grande partie d'enzymes qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés et en particulier des protéases susceptibles de coaguler le lait (Boufeldja, 2017).

Ce sont surtout les souches du genre *Bacillus* : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymixa* et *Bacillus coagulans*, qui ont fait l'objet de plusieurs recherches pour la production de coagulases. Leur utilisation demeure limitée par suite de réglementation stricte et leur prix de revient. D'autre part, leur aptitude à la coagulation est meilleure que celle d'origine végétale et moins bonne que celle des enzymes produites par les moisissures. Les caillés obtenus manquent de cohésion du

fait d'une trop forte activité protéolytique par comparaison à la présure animale (Alais, 1984).

- **D'origine fongique**

Au contraire, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure ; plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays. Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* (Boufeldja, 2017).

Chapitre II. Produits laitiers fermentés traditionnels

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de sa consommation sous la forme fraîche qui ont conduit au développement de technologies de production traditionnelle (Dharam et Narender, 2007 ; Lahsaoui, 2009). La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (Takahiro et *al.*, 2007; Shan-na et *al.*, 2011). La transformation du lait de chèvre en produits laitiers traditionnels algériens, tels que Raib, Lben et Jben est réalisée via une fermentation spontanée sans l'ajout d'une entrée sélectionnée (Badis et *al.*, 2004). Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien et ont une grande importance culturelle, médicinale, et économique ils ont été développés sur une longue période avec les compétences culinaires de fermiers en plus de la conservation des solides du lait pour plus longtemps à température ambiante (Lahsaoui, 2009 ; Djouhri et Madani, 2015).

II.1. La fermentation traditionnelle du lait

En Algérie, le lait fermenté et fromages sont fabriqués traditionnellement le plus souvent par les femmes à la maison (Medouni et *al.*, 2005) et servent à l'autoconsommation, le surplus pouvant être vendu (Bencharif, 2001).

La figure suivante schématise les méthodes de fabrication de principaux produits laitiers traditionnels en Algérie.

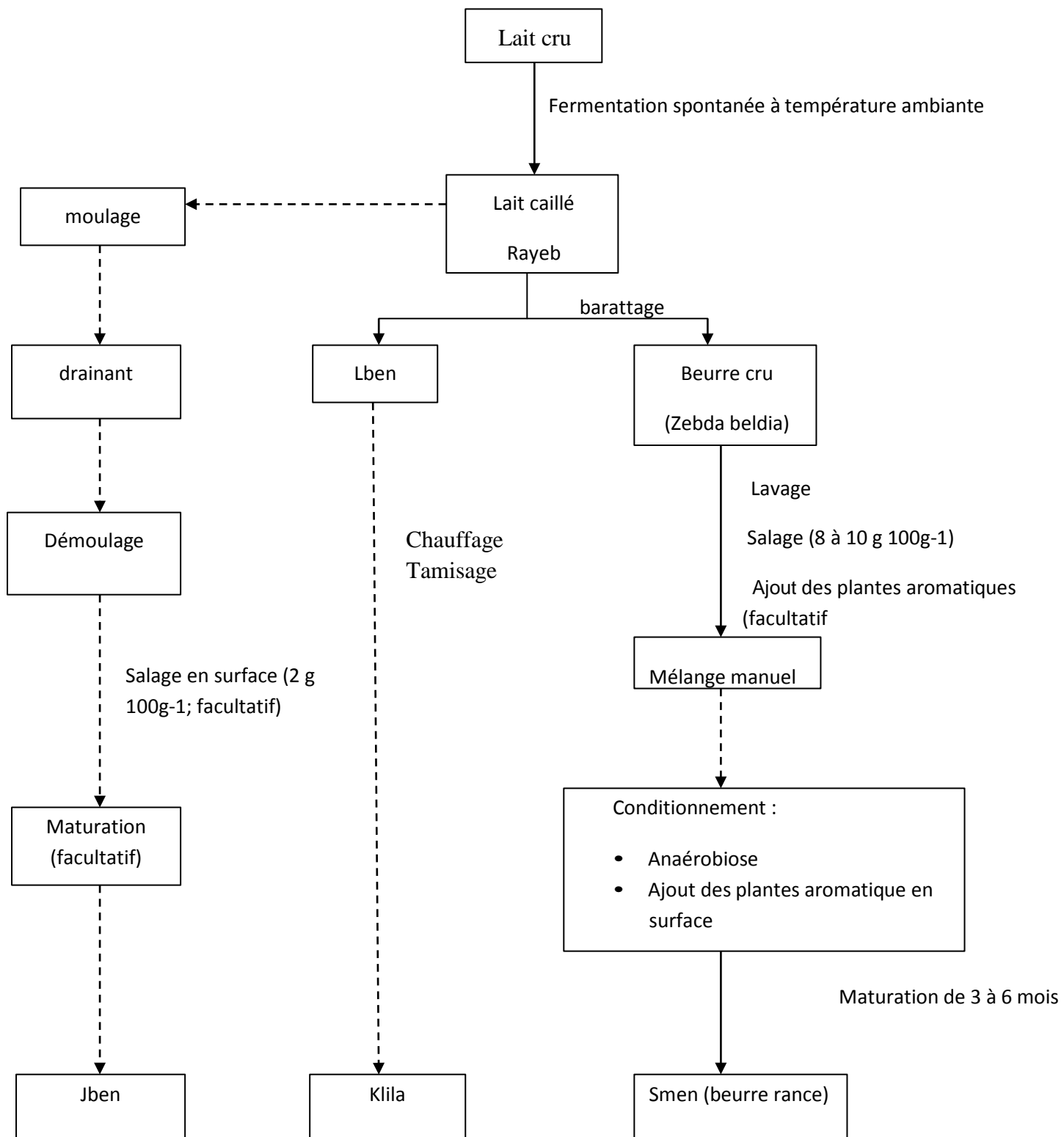


Figure 01 : Schéma récapitulatif des procédés de fabrication traditionnelle des produits laitiers fermentés (Benkerroum et Tamime ,2004)

II.2. Jben

Selon la norme du *Codex Alimentarius* et la norme internationale FAO/OMS, le fromage frais ou non affiné est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication. Aux termes de la réglementation française, la dénomination «fromage» est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours (Luquet et Corrieu, 2005 ; Bouadjaib, 2013).

Le « Jben » est le fromage frais le plus connu et consommé en Algérie depuis fort longtemps aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain. Dernièrement, la consommation de ce produit s'est accrue suite à l'installation dans les villes d'un grand nombre de laiteries traditionnelles qui préparent le «Jben» à partir du lait cru selon des procédures souvent artisanales (Bouadjaib, 2014).

II.3. Lben

Le leben ; c'est du lait débarrassé de sa crème, et qui a subi ensuite une fermentation lactique, l'acide lactique produit provient du dédoublement de la molécule de lactose par l'action du bacille lactique. L'acide lactique à la propriété, lorsqu'il se forme en excès, d'amener la coagulation de la caséine du lait. Cette coagulation est d'autant plus active que la température ambiante est plus élevée (Bendanou, 1981 ; Djouhri et Madani, 2015).

II.4. Klila

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

II.5. Smen (Dhan)

Le Smen est du beurre rance salé obtenu après transformation du beurre frais par lavage, saumurage et salage à sec (Benkerroum et Tamine, 2004).

Le terme « smen » désigne généralement des produits préparés de façon artisanale à partir du beurre fermier par lavage et salage, puis conditionnement dans des pots en terre et conservation à l'abri de l'air et de la lumière pour une durée variable d'au moins 6 mois.

Cette préparation fait ressortir les caractéristiques suivantes :

- ✓ Absence de tout traitement thermique,
- ✓ Le salage constituant le seul élément de conservation,
- ✓ Les conditions de stockage sont également originales (anaérobiose et température ambiante) (El Marrakchi et al, 1986 ; Sakili et Issouel, 2003 ;).

Avant le salage, le beurre peut exceptionnellement subir une cuisson de 1 h à 1 h et 30 min pour favoriser une certaine évaporation d'eau. De plus, le smen, après salage et avant son conditionnement, peut être aromatisé de thym sous forme de fragments (El Marrakchi et al, 1986).

II.6. Zebda

Selon la norme du Codex Alimentaire, le beurre est un « produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans huile ». Il est obtenu par barattage de la crème du lait (Luquet et Corrieu, 2005).

Elle contient la presque totalité des lipides du lait et 2,7 g de protéines pour 100 g. Le beurre est fabriqué à partir de la crème (le barattage) et contient 0,8 g de protéines pour 100 g (Vilain, 2010).

II.7. Composition des quelques produits laitiers fermentés traditionnel

Tableau 03 : valeurs moyenne des paramètres chimiques (g/100 g) des principaux produits laitiers traditionnels en Alger.

	leben	smen	klila
Humidité	90.8	14	12.530
Lactose	2.14	1.2*	ND
Protéine	1.93	3.2*	53.856
Matière grasse	0.2	81	13.843
Références	Boubekri et <i>al.</i> . (1984)	Boubekri et <i>al.</i> . (1984)	Boubekri et Ohta. (1996)

* : par rapport au poids sec.

ND : non déterminé.

Chapitre III. Les Entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Ces micro-organismes jouent un rôle essentiel dans la conservation (prolongation du temps de stockage) et dans la qualité bactériologique des aliments, tout en respectant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Cependant, ce sont des marqueurs de contamination fécale (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) également impliqués dans l'apparition de maladies nosocomiales. La plasticité génétique (transfert d'éléments génétiques) de ces bactéries leur permet, d'une part de s'adapter à de nombreux écosystèmes et, d'autre part, d'être vecteurs d'antibiorésistance et de virulence bactérienne. Par conséquent, l'emploi des entérocoques dans l'industrie alimentaire est de plus en plus controversé. Impliqués dans la fermentation de nombreux aliments (lait, végétaux, viandes et poissons), les entérocoques sont capables de produire diverses molécules antimicrobiennes (acide lactique, bactériocine ou encore peroxyde d'hydrogène). Ces propriétés les rendent indispensables à l'industrie agro-alimentaire. Employés comme micro-organismes de protection, ils doivent être minutieusement caractérisés et faire l'objet d'études préalables pour démontrer leur innocuité. La grande diversité des bactériocines (entérocoques) retrouvées dans ce genre bactérien pourrait être valorisée en développant des méthodes de purification qui permettraient de substituer l'utilisation de ces souches par l'emploi d'entérocoques sur les matrices alimentaires. (Aguilar-Galvez et al., 2010).

III.1. Taxonomie

L'espèce la plus fréquemment isolé chez l'homme a été décrite des 1899 par Thiercelin (Thiercelin, 1899) et appelé initialement *Streptococcus faecalis* par Andrewes et Horder en 1906. Dans les années 1930, et sur la base de système *lancefield serological typing*, les *Enterococcus* étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D). le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* en 1984 d'après les résultats des techniques de chimiotaxonomie et génétique moléculaire : hybridation ADN-ADN ou ADN-rARN, et de séquençage des oligonucléotides de la sous unité 16S de l'ARN des ribosomes (Farrow et al., 1983 ; Gravie et al., 1981 ; Ludwing et al., 1985). Ce genre comprend actuellement plus de 14 espèces, parmi lesquelles *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*

représentent plus de 90% des souches isolées en pathologie humaine (Collins et *al.*, 1989).

Le genre *Enterococcus* est placé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales, famille des Enterococcaceae, branche des *Clostridium*. Monstein et *al.* (1998) ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupes d'espèces. Actuellement, 35 espèces différentes ont été recensées sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S (tableau 04).

Tableau 04 : Les groupes de genre *Enterococcus* selon l'analyse de l'ARNr 16S (Aguilar-Galvez et *al.*, 2012).

Groupes	Espèces
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. hermannienseis</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. pseudoavium</i> et <i>E. raffinosus</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> et <i>E. columbae</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. asini</i> , <i>E. canintestini</i> et <i>E. dispar</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. caccae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i> , <i>E. silesiacus</i> et <i>E. termitis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. canis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hiraе</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. ratti</i> , <i>E. thailandicus</i> et <i>E. villorum</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> et <i>E. gallinarum</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. aquimarinus</i> , <i>E. camelliae</i> , <i>E. italicus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> et <i>E. sulfureus</i>

III.2. Caractéristique générale

Les *Enterococcus* sont des coccoïdes Gram+ oxydase positifs, généralement catalase négatifs. Certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase. Ils sont généralement des anaérobies facultatifs et non mobiles. 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). De plus, la majorité des entérocoques sont positifs au test de Voges-Proskauer qui relie la production

d'acétone à la fermentation du ribose. Ce test est largement utilisé dans la discrimination entre *Enterococcus* et *Streptococcus*.

Les *Enterococcus* sont des micro-organismes mésophiles qui se développent dans une gamme de températures allant de 10 à 45 °C, avec une température optimale de 35 °C. Certaines espèces peuvent survivre à 60 °C pendant 30 min. Ils poussent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl, de lait renfermant 0,1 % de bleu de méthylène, de concentration en sels biliaries de 40 % et dans une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6.

Les *Enterococcus* sont homofermentaires. Ils produisent essentiellement de l'acide lactique et en quantité moindre, de l'acétate, du formiate et de l'éthanol. Les produits finaux du métabolisme peuvent changer en fonction de la présence ou non d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. Ainsi en anaérobiose, le lactate est le principal produit du métabolisme du glucose, tandis qu'en condition d'aérobiose, les produits du métabolisme sont l'acétate et le CO₂. Ils sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le N-acétyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le β-gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le D-mannose, le β-D-méthyle glucopyranoside, le ribose, la salicine et le tréhalose (Schleifer et *al.*, 1984 ; LeBlanc, 2006).

III.3. Habitat

Les entérocoques sont de nature ubiquiste, leur capacité d'adaptation à des environnements inhospitaliers permet de les retrouver dans différentes eaux (usées, douces et de mer), dans le sol, sur les végétaux et dans le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud (y compris celui de l'homme) (Manero et *al.*, 1999). Leur adaptabilité à différents écosystèmes a permis de retrouver trois clones d'*E. faecalis* et d'*E. casseliflavus* dans du lait, dans du fromage ou dans des matières fécales humaines (Gelsomino et *al.*, 2002).

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 10⁵ à 10⁷ UFC/g (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. gallinaru* 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).

• Produits laitiers

Les entérocoques les plus couramment présents dans les fromages sont *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* (Giraffa, 2003), aussi bien les fromages à base de lait cru que de lait pasteurisé provenant de chèvre, de brebis ou de vache ; on retrouve moins souvent *E. casseliflavus* (Burdychova et al., 2007). Les entérocoques ont un rôle important dans la maturation de plusieurs variétés de fromages, probablement en raison de leur activité protéolytique, lipolytique, de leur capacité de production du diacétyle et d'autres composants volatils contribuant à l'aromatisation, la flaveur et au goût caractéristique (Franz et al., 1999). La concentration d'entérocoques dans les fromages frais se situe entre 10^4 à 10^6 UFC/g, alors que celle des fromages fermentés est de l'ordre de 10^5 à 10^7 UFC/g (Giraffa, 2003).

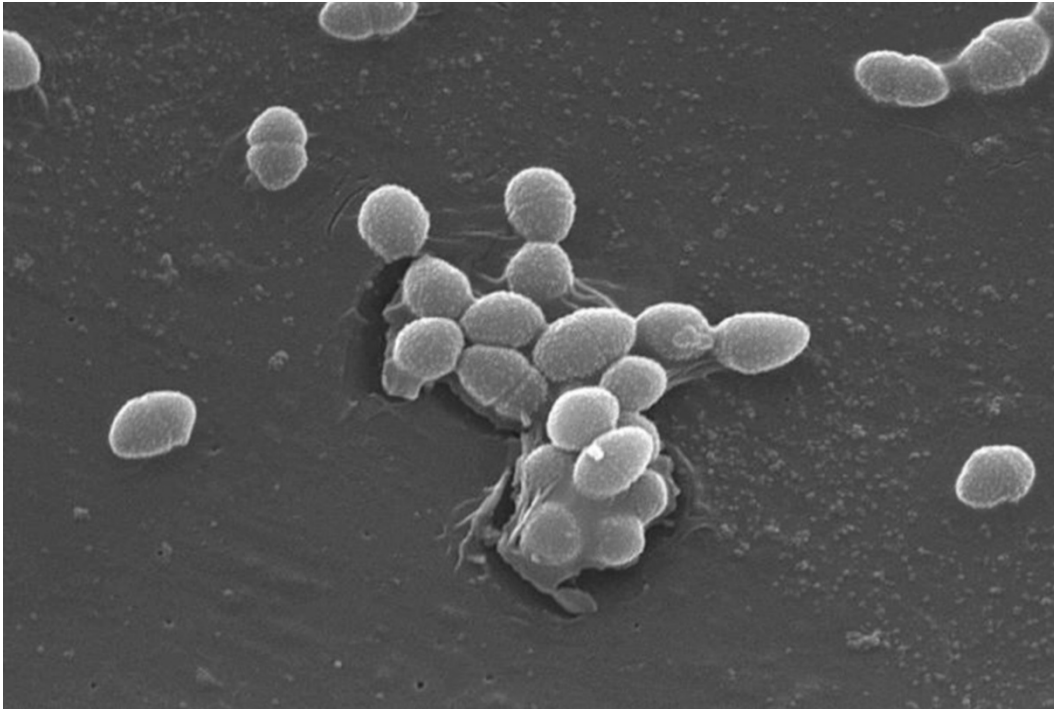


Figure 02 : *Enterooccus faecalis* (fr.wikipedia.org)

III.4. Applications biotechnologiques des entérocoques

L'incorporation de micro-organismes à des aliments peut avoir quatre objectifs différents :

- améliorer la sécurité alimentaire (inhiber des pathogènes),
- améliorer la stabilité (prolongation de la vie du stockage),
- offrir une diversité de produits (modification de la matière première),
- apporter des bénéfices pour la santé (effets positifs sur la flore intestinale).

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, entre autres. 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 (Aguilar-Galvez et *al.*, 2010).

III.4.1. Les entérocinés (bactériocines des entérocoques)

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées entérocinés. Ces bactériocines sont des peptides de faible poids moléculaire constitués de 20 à 60 acides aminés cationiques et amphiphiles. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (Van Belkum et *al.*, 2000 ; Chen et *al.*, 2003 ; Dortu et *al.*, 2009). Généralement, les bactériocines sont constituées de deux domaines structuraux : un domaine hydrophile et cationique en position N-terminale (appelé *leader* double-glycine) dont la longueur minimale est de 14 résidus et qui peut atteindre 30 résidus (Nes et *al.*, 1996) ; la seconde région, en position C-terminale, est hydrophobe et/ou amphiphile (Johnsen et *al.*, 2005).

III.4.2. Classification des entérocinés

Franz et *al.* (2007) ont proposé une classification des entérocinés, sur base de leurs séquences et des modifications post-traductionnelles. Le tableau 05 inclut quatre classes.

Tableau 05 : Classification des entérocoques (Franz et *al.*, 2007)

Classe	Sous-classe	Sous-groupe / Caractéristiques	Exemples
Classe I	Entérocoques lantibiotiques	Bactériocine hémolytique Formé de deux peptides <i>cylL_L</i> et <i>cylL_S</i> Son action a besoin de la présence des deux peptides	Cytolysine
Classe II, petits peptides non lantibiotiques	<u>II.1</u> Possède une région cationique hydrophile avec une séquence conservée, YGNGVxC en N-terminale Deux cystéines formant un pont disulfure dans la partie N-terminale	<u>Sous-groupe 1</u> Possède un transporteur type-ABC pour la sécrétion des entérocoques	Entérocoque A, entérocoque CRL35, mundticine et mundticine KS
		<u>Sous-groupe 2</u> La sécrétion est réalisée via une pré-protéine maturée Sont coproduites avec une protéine de l'immunité	Entérocoque P, entérocoque SEK4, bactériocine 31, bactériocine T8 et bactériocine RC714
	<u>II.2</u> Synthétisées sans peptide leader Ne possède pas la séquence conservée, ni le système de sécrétion ABC transporteur	<u>Sous-groupe 1</u> Protéines monomériques	Entérocoque RJ-11, entérocoque Q et entérocoque EJ97
		<u>Sous-groupe 2</u> Besoin de la formation d'un complexe hétérodimérique	Entérocoque L50 (dimère A et B) et entérocoque MR10 (dimère A et B)
	II.3	Entérocoques linéaires avec un peptide <i>leader</i>	Entérocoque B, bactériocine 32 et entérocoque 1071 A et B
Classe III, entérocoques cycliques		Peptides cycliques	Entérocoque AS-48 et entérocoque AS-48 RJ
Classe IV, protéines de haut poids moléculaire		Peptide de haut poids moléculaire (34.5 kDa) et thermolabile	Entérolysine A

Partie

Expérimentale

Chapitre I. Matériel et Méthodes

I.1. Échantillonnage

Dans le but d'isoler des souches d'*Enterococcus* spp. À partir des produits laitiers fermentés traditionnels et d'étudier leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis des bactéries et des moisissures pathogènes, cinq types de produits laitiers fermentés traditionnels ont été collectés à partir de 3 régions différentes dans la wilaya de Laghouat : Ain Madi, Laghouat et El Assafia (cf. Figure 03). Ces régions ont été choisies sur la base de leurs particularités de préparer ces produits traditionnellement et leurs disponibilités sur marché. Les produits choisis pour cette étude sont : Jben, Leben, Smen, Zebda et Klila. Pour chaque produit, quatre échantillons de 150 g ont été collectés aseptiquement dans des flacons en plastique stérile. En suite, les échantillons ont été étiquetés et transportés dans une enceinte isotherme (glacière) avec de la glace pendant un délai aussi court que possible vers le laboratoire d'analyse microbiologique, Département des Sciences Agronomiques, Université de Laghouat. Tous les échantillons sont conservés directement dans le réfrigérateur de laboratoire à 4°C jusqu'à l'analyse.



Figure 03 : Localisation des trois régions de provenance des produits laitiers fermentés traditionnels (Google maps, 2018).

I.2. Isolement des entérocoques

L'isolement des entérocoques est réalisé par la méthode d'enrichissement décrite par Zamudio-Maya et *al.* (2008) avec des modifications mineures. Commencant par une homogénéisation des 4 échantillons de chaque produit laitier fermenté dans un flacon stérile de 100 mL contenant le milieu Brain Heart Infusion Broth (BHIB). Notons que pour les produits liquides comme lben, 10 ml de chaque échantillon ont été homogénéisés dans 100 mL du milieu BHIB, tandis que pour les produits solides (jben, smen, zebda et klila), 10 g de chaque échantillon ont été homogénéisés dans 100 mL du milieu BHIB. Après une incubation des flacons à 37°C pendant 24 h, une série de dilutions décimales est réalisée, puis un aliquot de 0.1 mL de chaque dilution est étalé sur un milieu de culture sélectif « Enterococcus Selective Agar » ou milieu de Slanetz-Bartley en boîte de Petri. Après incubation à 37°C pendant 48h, les colonies présentant des aspects macroscopiques caractéristiques aux entérocoques (couleurs rouge et marron) sont repiquées et purifiées par la méthode des stries sur le même milieu sélectif ESA. Toutes les colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

I.2.1. Conservation des isolats

La conservation des souches a été effectuée dans des tubes contenant 5 mL de bouillon BHIB. Après incubation à 37°C pendant 48h, les souches sont gardées à 4°C pour une période de courte durée (4 semaines).

I.3. Caractéristiques phénotypiques des souches

1.3.1. Etude morphologique

L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre et l'aspect des colonies. L'aspect microscopique par l'intermédiaire de coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries.

- **Coloration de Gram**

Dans cette étude, la coloration de gram a été réalisée selon la technique de Schaad et *al.* (2001). Notons que, les entérocoques sont des cocci ovoïdes à gram positif et disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules.

1.3.2. Etude biochimique

- **Test de catalase**

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂ à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène, s'il n'y a pas de bulles c'est une réaction catalase négative (Lévy et *al.*, 1992).

- **Galerie biochimique miniaturisée**

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants (BioMérieux, Marcy l'étoile, France). La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubules contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de la fermentation de sucres. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe n°1), et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (BioMérieux, Marcy l'étoile, France).

- **Mode opératoire**

Préparation et inoculation de la galerie : Une atmosphère humide est créée par répartition de quelques gouttes de l'eau distillée dans les alvéoles. Les micro-tubes sont ensuite inoculés avec une suspension bactérienne très dense préalablement préparée dans 2 ml d'API Suspension Medium et ajustée à 4 de McFarland.

- les cupules des tests VP à LAP sont remplies avec 100µl de la suspension bactérienne ;
- uniquement les tubes des tests ADH à GLYG sont remplis par la suspension bactérienne ;
- les cupules des tests ADH à GLYG sont remplies par l'huile de paraffine stérile pour créer une anaérobiose.

Les galeries sont ensuite incubées à 37°C en aérobiose pendant 4h00 à 4h30 pour une première lecture et 24h (±2h) si nécessaire pour une deuxième lecture.

Lecture et interprétation : Après 4h d'incubation, les tests suivants nécessitent l'addition de réactifs spécifiques:

- Test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2
- Test HIP : 2 gouttes de NIN
- Tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B

Après 10 min, toutes les réactions sont notées sur la fiche de résultats et interprétées à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**TM. Après 24h, uniquement les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG sont relit (BioMerieux, Marcy l'étoile, France).

I.4. Test d'antibiorésistance

Pour cette étude six antibiotiques ont été choisis : Pénicilline (10 μ g), Vancomycine (30 μ g), Erythromycine (15 μ g), Céfalexine (30 μ g), Ampicilline (10 μ g), Chloramphénicol (30 μ g), utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par l'OMS (2011). Pour chaque isolat, une culture bactérienne a été préparée à partir d'une culture d'une nuit dans un bouillon BHIB à 37°C. Après l'incubation des cultures d'entérocoques, 0.5 ml de chaque culture ont été transférées dans 10 ml d'eau physiologique (0.9%) pour obtenir une suspension bactérienne de 10^8 cellules/mL. Ensuite, la surface du milieu gélosé Mueller-Hinton (MHA) a étéensemencée en surface avec 0.1ml de la suspension bactérienne précédemment préparée (2 boîtes /isolat). Enfin, les disques d'antibiotiques ont été déposés à l'aide d'une pince stérile sur le milieu MHA (3 antibiotiques / boîte). 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 centimètre (cm) selon le tableau n°07.

I.5. Etude de l'activité hémolytique

Pour la mise en évidence de l'activité hémolytique des entérocoques isolés, la surface de la gélose au sang additionnée du sang de mouton à 5% (v/v) estensemencée en surface avec 0.1 ml de chaque suspension bactérienne précédemment

préparée selon la méthode décrite par Yoon *et al.* (2008). Après incubation à 37 ° C pendant 24-48 h, l'activité hémolytique est interprétée comme suit :

- la présence d'une couleur verte autour des colonies (hémolyse partielle): α hémolytique.
- la présence d'une zone claire d'hydrolyse autour des colonies (hémolyse totale) : β hémolytique.
- absence de réaction hémolytique autour des colonies (absence d'hémolyse) : γ hémolytique

I.6. Activité antimicrobienne

I.6.1. Préparation des surnageants bactériens d'entérocoques

L'activité antimicrobienne vis-à-vis les bactéries et les moisissures pathogènes a été déterminée par la méthode de diffusion en puits sur gélose décrite par Magnusson et Schnurer (2001). Brièvement, les isolats d'entérocoques sélectionnés pour cette étude sont ensemencés dans des tubes contiennent bouillon BHIB et incubés à 37°C pendant 24h. Ensuite, les surnageants ont été obtenus par centrifugation des cultures d'entérocoques à 12000g pendant 10 min, puis les surnageants ont été récupérés à l'aide d'une seringue et conservés dans le congélateur du laboratoire à 18°C jusqu'à l'analyse.

I.6.2. Préparation des suspensions bactériennes

Dans cette étude, trois souches bactériennes de référence ont été évaluées: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923, proviennent de la collection du Laboratoire Régional Vétérinaire de Laghouat. Tous les pathogènes ont été cultivés en bouillon nutritive pendant 24 heures à 37 °C. Ensuite, 100 μ l de chaque culture ont été transférées dans 10 mL de solution saline stérile 0.9% pour obtenir une suspension de stock d'environ 10^8 UFC/mL.

I.6.3. Préparation des suspensions fongiques

Pour tester l'activité antifongique, 3 souches fongiques filamenteuses ont été choisis: *Fusarium graminearum* MUCL 53452 et *Penicillium expansum* MUCL 29192 sont des souches de référence proviennent de la collection BCCM (Belgian

Co-ordinated Collection of Micro-organisms), tandis que la souche fongique *Aspergillus parasiticus* (CBS 100926) provient de la collection CBS culture collection of micro-organisms. Pour chaque souche fongique, l'inoculum doit être préparé 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 du Tween 20 et le transféré dans 3 mL de solution saline stérile 0.9%. Ensuite, la densité optique (DO) a été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway, 6405 UV/VIS) à 530 nm pour obtenir une suspension de stock de $0.4-5 \times 10^6$ spores/mL.

I.6.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Des puits (diamètre de 5 mm) ont été découpés dans le milieu gélosé Mueller-Hinton (MHA) contenant 10^6 UFC / ml des souches bactériennes cibles et dans le milieu PDA contenant $0.4-5 \times 10^4$ spores/ml des souches fongiques testées, puis 100 µl de surnageants ont été ajoutés aux puits. Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24-48 h, 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.

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Etude morphologique et biochimique

A partir des 5 produits laitiers fermentés traditionnels, 50 souches ont été isolées et purifiées pour la recherche des entérocoques. Parmi les 50 souches isolées, 26 isolats sont révélées positives à la coloration de Gram et catalase négative.

L'étude macroscopique réalisée sur milieu ESA nous a permis d'observer de petites colonies rouges ou marron, lisses et régulières. L'examen microscopique nous a permis également de sélectionner des bactéries qui présentent une forme de cocci ovoïdes à Gram positifs, disposés en courtes chainettes de cellules. Ces dernières ont été choisies pour l'identification phénotypique à l'aide des galeries API 20 strep.

La lecture des résultats nous a permis d'identifier 15 isolats d'*Enterococcus faecium* (58%), 5 isolats d'*Enterococcus faecalis* (19%), 3 isolats d'*Enterococcus raffinosus* (11%), 2 isolats d'*Enterococcus gallinarum* (8%) et 1 isolat d'*Aerococcus christensenii* avec une prédominance de 4% (cf. tableau 07).

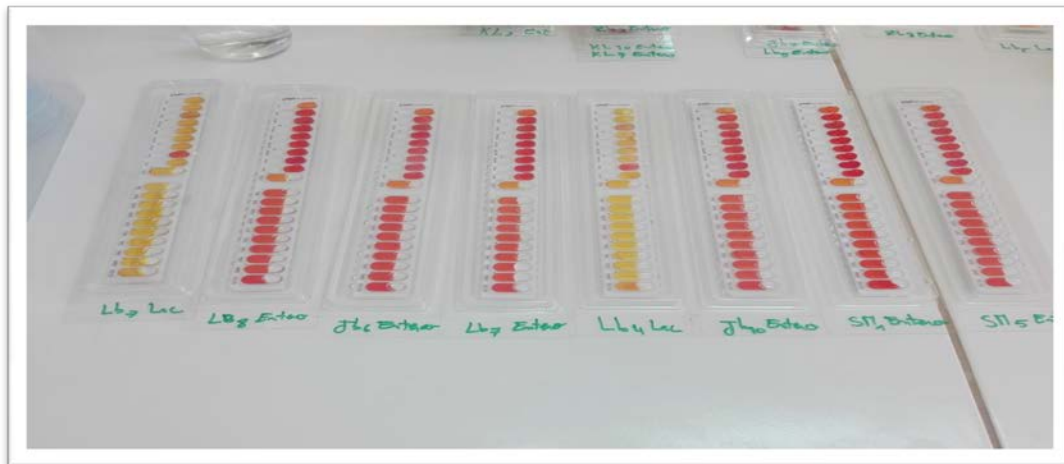


Figure 04 : Présentation des résultats des galeries API 20 Strep (Photo originale, 2018).

Tableau 06 : Résultats de l'étude morphologique et biochimique des isolats d'entérocoques

Origine	Isolats	Gram	Forme	Catalase	Galerie API 20 Strep	
					Identification	% Similarité
Klila	KL1	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
	KL2	+	Cocci	–	<i>Enterococcus gallinarum</i>	88%
	KL3	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
	KL4	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
	KL6	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
	KL7	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
	KL10	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
Zebda	Zb3	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
	Zb4	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	96%
	Zb6	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	96%
	Zb7	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
	Zb8	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
Lben	Lb5	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	94%
	Lb7	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	96%
	Lb8	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	94%
	Lb9	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	90%
	Lb11	+	Cocci	–	<i>Enterococcus raffinosus</i>	77%
	Lb12	+	Cocci	–	<i>Enterococcus raffinosus</i>	81%
	Lb13	+	Cocci	–	<i>Enterococcus raffinosus</i>	86%
Lb14	+	Cocci	–	<i>Enterococcus gallinarum</i>	84%	
Jben	Jb6	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	90%
	Jb7	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	90%
	Jb10	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecalis</i>	90%
Smen	Sm1	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
	Sm5	+	Cocci	–	<i>Enterococcus faecium</i>	77%
	Sm11	+	Cocci	–	<i>Aerococcus christensenii</i>	78%

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif et catalase négative, disposés en courtes chainettes de 2 à 4 cellules (Bouvet et Cowry, 1994). Ces bactéries sont ubiquistes, se trouvent également sur les plantes, dans le sol et dans plusieurs produits alimentaires artisanaux (Svec et Sedlacek, 1999). Parmi les bactéries isolées à partir d'aliments fermentés, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* et *E. gallinarum* (Singh et al., 2014). En générale, les *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* prédominent plusieurs produits alimentaires, telles que le lait et les viandes (Foulquie et al., 2006;; Klein, 2003), ainsi que dans des divers produits fermentés, y compris les saucisses, le fromage, les légumes fermentés et le lait fermenté avec une longue histoire de consommation sans danger (Hugas et al., 2003). Plusieurs auteurs (Benkerroum et al., 1984; Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi 1987; Benkerroum et Tamime 2004) ont rapporté sur la prédominance des *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* dans les produits laitiers traditionnels nord-africains. Du côté positif, les entérocoques sont étroitement impliqués dans la production d'aliments fermentés traditionnels et les préparations probiotiques. Ce rôle bénéfique des entérocoques dans le développement des caractères organoleptiques du fromage a conduit à l'inclusion de souches d'entérocoques en tant que cultures starter ou adjuvants de démarrage (Bhardwaj et al. 2008).

II.2. Antibiorésistance

Les résultats de test d'antibiorésistance des souches d'entérocoques sélectionnées pour cette étude sont rassemblés dans le tableau n°7.

Tableau 07 : Résultat du test antibiorésistance des entérocoques isolés produits laitiers fermentés traditionnels

Isolats	Antibiorésistance					
	Ery 15	Chl 30	Van 30	Cxn 30	Pen 10	Amp 10
KL1**	S*	S	S	R	R	R
KL2	R	S	S	R	R	R
KL3	S	S	S	R	R	S
KL4	R	S	R	R	R	R
KL6	R	S	S	R	R	R
KL7	R	S	S	R	R	R
KL10	R	S	S	R	R	R
Zb3	S	S	S	R	R	R
Zb4	I	S	S	R	R	R
Zb6	R	S	S	R	R	R
Zb7	R	S	S	R	R	R
Zb8	R	S	S	R	R	R
Lb5	I	S	S	R	R	R
Lb7	R	S	S	R	R	R
Lb8	S	S	R	S	R	R
Lb9	R	S	R	S	R	R
Lb11	I	S	R	R	R	R
Lb12	R	S	R	R	R	R
Lb13	I	S	R	R	R	R
Lb14	R	S	R	R	R	R
Jb6	R	S	S	R	R	R
Jb7	R	S	S	R	R	R
Jb10	S	S	S	R	R	R
Sm1	S	S	I	R	R	R
Sm5	I	S	S	R	R	R
Sm11	R	S	R	S	R	R

Ery : Erythromycine, Chl : Chloramphénicol, Van : Vancomycine, Cxn : Céfalexine, Pen : Pénicilline, Amp : Ampicilline.

*: Résistant; S: Sensible; I: Intermédiaire.

** : les codes des bactéries sont présentés dans le tableau 06.

Selon les normes de l'OMS (2011) présentées dans le tableau ci-dessous, nos résultats montrent que toutes les souches d'entérocoques isolées des produits laitiers fermentés traditionnels sont sensibles au chloramphénicol et résistantes à la pénicilline, ampicilline et céfalexine. Parmi les 26 isolées, 6 souches seulement sont sensibles à l'érythromycine et 5 isolats présentent une réaction intermédiaire à ce dernier. Cependant, toutes les souches d'entérocoques testées sont sensibles au vancomycine, à l'exception de 8 isolats qui ont montré une résistance considérable à cet antibiotique et une présente une réaction intermédiaire.

Tableau 08: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Enterococcus* spp (OMS, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R*	I	S
Pénicilline	10 µg	≤14	-	≥15
Ampicilline	10 µg	≤16	-	≥17
Erythromycine	15 µg	≤13	14-22	≥23
Céfalexine	30 µg	≤14	-	≥15
Vancomycine	30 µg	≤14	15-16	≥17
Chloramphénicol	30 µg	≤12	13-17	≥18

* R: Résistant; S: Sensible; I: Intermédiaire

La résistance fréquente des entérocoques aux antibiotiques couramment utilisés et le risque de transmission de gènes résistants aux antibiotiques au d'autres bactéries opportunistes ou pathogènes sont des préoccupations particulières pour leur innocuité dans les aliments ou comme agents de lutte biologique (Giraffa 2002). La résistance aux antibiotiques englobe à la fois la résistance naturelle (intrinsèque) et la résistance acquise (transférable). Les entérocoques possèdent un large spectre de résistances aux antibiotiques dans ces deux types (Klare et *al.*, 2003). Des exemples de résistance intrinsèque aux antibiotiques comprennent la résistance aux céphalosporines, aux β -lactames, aux sulfonamides et aux faibles niveaux de clindamycine et d'aminoglycosides, tandis que des exemples de résistance acquise comprennent la résistance au chloramphénicol, à l'érythromycine, à des niveaux élevés de β -lactames, aux fluoroquinolones et aux glycopeptides, tels que la vancomycine (Franz et *al.*, 2003). La résistance aux céphalosporines et aux aminoglycosides chez certaines espèces d'entérocoques a été également rapportée par Morrison et *al.* (1997) et

Tendolkar et *al.* (2003). Cependant, un rapport récent a également testé la sensibilité aux antibiotiques d'une souche d'*E. faecium* d'origine animale, et que cette souche s'est révélée très sensible aux antibiotiques testés, bien qu'une résistance à la vancomycine ait été observée pour cette souche (Zheng et *al.*, 2015). En général, nos résultats ont montré une grande sensibilité de tous les isolats aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine qui est considérée comme un problème de santé majeur dans le monde entier.

II.3. Activité hémolytique

Un autre rôle important dans la virulence des entérocoques est la production d'hémolysine par les entérocoques qui est considérée comme un facteur de risque pour la santé humaine. Le tableau n°09 montre qu'aucune réaction hémolytique (γ hémolyse) n'a été détectée dans les 26 souches sélectionnées pour cette étude. L'hémolysine joue un rôle important dans la virulence des entérocoques, car elle peut augmenter les risques d'infection (Morandi et *al.*, 2006). L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité, compte tenu de la sensibilité à la vancomycine et de l'absence de gène de la cytolysine (De Vuyst et *al.*, 2003); néanmoins, l'absence de cette activité chez les entérocoques isolés des aliments ne signifie pas que ces bactéries sont non virulentes (Franz et *al.*, 1999a). Une compréhension approfondie de toutes les caractéristiques contribuera certainement à l'évaluation de la sécurité des entérocoques.

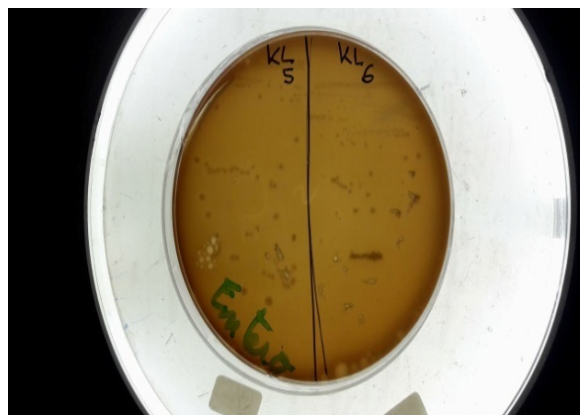


Figure 05 : Présentation des résultats de teste hémolyse KL5 et KL6 (γ hémolytique)
(Photo originale. 2018).

Tableau 09 : Résultat de l'activité hémolytique des entérocoques isolés à partir des produits laitiers fermentés traditionnels

Origine	Codes	Isolats	Activité hémolytique
Klila	KL1	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	KL2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	γ
	KL3	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	KL4	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	KL6	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	KL7	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	KL10	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
Zebda	Zb3	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Zb4	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Zb6	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Zb7	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Zb8	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
Lben	Lb5	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ
	Lb7	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Lb8	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ
	Lb9	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Lb11	<i>Enterococcus raffinosus</i>	γ
	Lb12	<i>Enterococcus raffinosus</i>	γ
	Lb13	<i>Enterococcus raffinosus</i>	γ
Jben	Jb6	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ
	Jb7	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ
	Jb10	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ
Smen	Sm1	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Sm5	<i>Enterococcus faecium</i>	γ
	Sm11	<i>Aerococcus christensenii</i>	γ

II.4. Recherche de l'activité antimicrobienne

Le tableau n°10 montré les résultats de l'activité antifongique et antibactérienne deux souches d'entérocoques sélectionnées pour cette étude. Sur les 26 souches d'entérocoques identifiées, 2 souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les deux sont des *Enterococcus faecium* Zb4 et Lb7, identifiées phénotypiquement avec un taux de similarité de 96%.

Tableau 10 : Résultat de test d'activité antimicrobienne des entérocoques sélectionnés pour cette étude

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 27853	<i>A. parasiticus</i> CBS 100926	<i>F. graminearum</i> MUCL 53452	<i>P. expansum</i> MUCL 29192
<i>E. faecium</i> Zb4	-	-	+	-	+	++
<i>E. faecium</i> Lb7	-	-	+	-	+	++

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

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'entérocoques testés ont inhibé totalement la croissance de *P. expansum*, tandis qu'une faible inhibition a été observée sur la croissance des *S. aureus* et *F. graminearum*. *E. coli*, *P. aeruginosa* et *A. parasiticus* ont montré une résistance considérable envers les surnageant d'entérocoques testés.

Les entérocoques produisent des entérocoques puissantes qui présentent un grand intérêt en raison de leur large spectre d'activité contre les bactéries et les moisissures pathogènes. Plusieurs auteurs (Torodov et Dicks 2005, Belgacem et *al.*, 2010, Gong et *al.*, 2010) ont conclu que l'activité des entérocoques vis-à-vis des bactéries à Gram négatif est très rare en raison de la couche de lipopolysaccharides présente dans leurs membranes externes. De plus, des rapports antérieurs ont également prouvé que les entérocoques producteurs de bactériocines présentaient un fort effet inhibiteur contre un large éventail de bactéries Gram positives, y compris *Staphylococcus* et *Listeria* (Hosseini et *al.*, 2009, Belgacem et *al.*, 2010, Fhoula et *al.*, 2013), ces observations

sont en accord avec nos résultats. De résultats similaires montrent que *E. faecium* PC4.1 présentait une forte croissance d'inhibition pour *Fusarium* ssp. et *Cladosporium* (Hadj-Sfaxi et al., 2011), tandis que 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 souligné leur utilisation potentielle en tant qu'agents de lutte biologique.

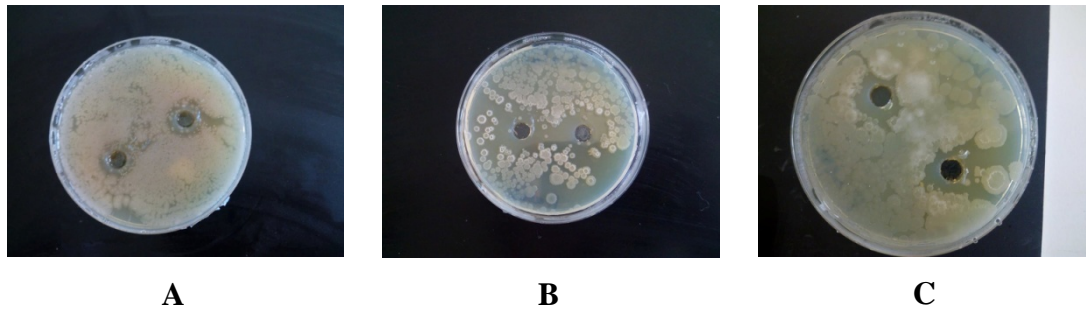


Figure 06 : Activité antibactérienne des souches d'entérocoques vis-à-vis ; (A) *Escherichia coli*, (B) *Staphylococcus aureus*, (C) *Pseudomonas aeruginosa* (photo originale. 2018).

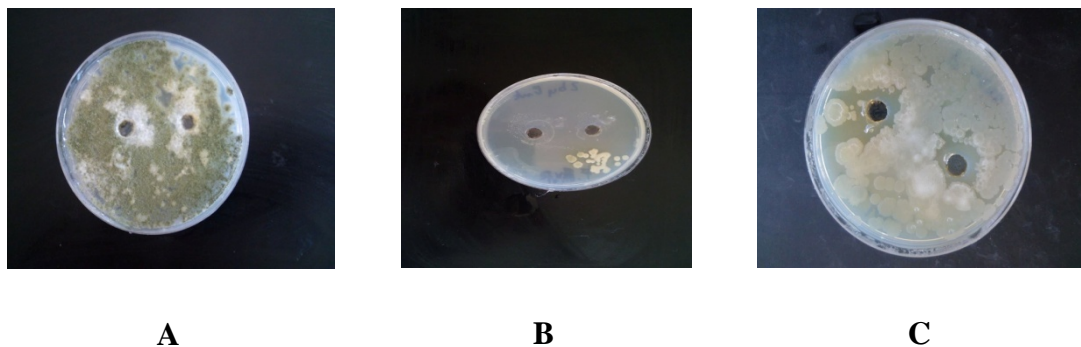


Figure 07 : Activité antifongique des souches d'entérocoque vis-à-vis ; (A) *Aspergillus parasiticus*, (B) *Penicillium expansum*, (C) *Fusarium graminearum* (photo originale. 2018).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail nous a permis d'identifier 26 isolats dont *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* représentent 58% et 19% du total des bactéries isolées de 5 produits laitiers fermentés traditionnels (Lben, Jben, Smen, Klila et Zebda), respectivement. La prédominance de ces bactéries est probablement due à son large spectre de résistance naturelle et acquise et sa capacité de survivre dans des conditions défavorables telles que le pH acide et la salinité.

Toutes les souches d'entérocoques isolées ont montré une grande sensibilité aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine qui est considérée comme un problème de santé majeur dans le monde entier. Les entérocoques possèdent en général un large spectre de résistances aux antibiotiques à la fois intrinsèque et acquise. De plus, aucune réaction hémolytique (γ hémolyse) n'a été détectée dans les 26 souches sélectionnées pour cette étude. L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité.

Sur les 26 souches d'entérocoques identifiées, 2 souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antimicrobienne. Les résultats montrent que les surnageants d'entérocoques testés ont inhibé totalement la croissance de *P. expansum*, tandis qu'une faible inhibition a été observée sur la croissance des *S. aureus* et *F. graminearum*. *E. coli*, *P. aeruginosa* et *A. parasiticus* ont montré une résistance considérable envers les surnageant d'entérocoques testés. Le pouvoir antimicrobien des entérocoques pourrait être favorisé par leur capacité de produire des métabolites actifs tels que les entérocoques qui possèdent des effets inhibiteurs remarquables contre une large éventail de microorganismes pathogènes. Cependant, l'activité de ces métabolites vis-à-vis des bactéries à Gram négatif est très rare en raison de la couche de lipopolysaccharides présente dans leurs membranes externes.

Enfin, cette étude primilaire necessite d'être poursuivi par d'autres travaux complémentaires et qui peuvent être envisagées comme perspectives :

- Confirmer génotypiquement les différents isolats d'entérocoques isolés,
- Etudier certains aspects sécuritaires et technologiques tels que l'absence de facteurs de virulence, la production des amines biogènes et l'incorporation de ces bactéries dans des matrices alimentaires,

- Isoler et caractériser les composés antimicrobiens des entérocoques,
- Déterminer le mécanisme d'action des métabolites antimicrobiens produits par ces bactéries.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques :

- Abd-El Salam, M., & Benkerroum, N. (2006). North African brined cheeses. *Brined cheeses*, 139-187.
- Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., & Thonart, P. (2012). Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(1), 67-76.
- Alais, C. (1984). Sciences du lait: principes des techniques laitières, 4 ème Edition. *Sepaic*, Paris, 814 p.
- And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.
- Andrewes, F. W., & Horder, T. (1906). A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet*, 168(4334), 775-783.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588.
- Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., & Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Bencharif, A. (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: état des lieux et problématiques. *Options Méditerranéennes Série B Etudes et Recherches*, 32, 25-45.
- Bendanou, D. (1931). L'industrie beurrière chez les pasteurs nomades du sud-Algérien. *Le Lait*, 11(106), 570-579.
- Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21(4), 399-413.
- Benkerroum, N., Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1984). Hygienic quality of Moroccan lben. *Microbiol. Alim. Nutr*, 2, 199-206.

- Bennik, M. H., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G., & Smid, E. J. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1373(1), 47-58.
- Bhardwaj, A., Malik, R. K., & Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian journal of microbiology*, 48(3), 317-325.
- BOUADJAIB, S. (2014). *Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques* (Doctoral dissertation).80p
- Boubekri, C., Elaraki, A. T., Berrada, M., & Benkerroum, N. (1984). Caractérisation physico-chimique du Iben marocain. *Le lait*, 64(643-644), 436-447.
- Boubekri, K., & Ohta, Y. (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(4), 501-505.
- BOUFELDJA, B. *Etude physico-chimique et microbiologique d'un fromage frais traditionnel «jben» fabriqué par «hakka»*(Doctoral dissertation).39p
- Bouvet, A., & Couvry, G. (1994). Identification des entérocoques en microbiologie clinique. *Médecine et maladies infectieuses*, 24, 132-140.
- Broome, M. C., & Hickey, M. W. (1990). Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(2), 53-59.
- Burdychova, R., & Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 149-155.
- Codex Alimentarius. (1999). Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie. *Codex Stan* (206-1999). 1-4.
- Cogitore, A. (1972). *Traité pratique de réglementation laitière*. Ed. du Sapin.
- Collins, M. D., Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., & Williams, A. M. (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(4), 453-460.

- De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., ... & Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4), 1069-1074.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H., & Dicks, L. M. T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 433-444.
- De Vuyst, L., Moreno, M. F., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318.
- Deforges, J., Derens, É., Rosset, R., & Serrand, M. (1999). *Maîtrise de la chaîne du froid des produits laitiers réfrigérés*. Paris.
- Devriese, L. A., Van de Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R., & Schleifer, K. H. (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(3), 257-259.
- Dharam, P., Narender, R. P. (2007) . *Indian traditional dairy products: an overview*. *International Conference on Traditional Dairy Foods*. Ed Ndri, Karnal. India.
- Djouhri k. Madani S. (2015). *Etude microbiologique d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben) : isolement et identification des bactéries lactiques*. Mémoire de Master, Biologie, Ouargla. 57p.
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.
- El Marrakchi, A., Berrada, M., Chahboun, M., & Benbouhou, M. (1986). Etude chimique du smen marocain. *Le Lait*, 66(2), 117-133.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M., & Bercovier, H. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of

- Lactococcus garvieae, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 32(2), 85-88.
- Ennahar, S., & Cai, Y. (2005). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 589-592.
 - FAO/OMS, 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, *Organización Mundial de la Salud*.
 - Farrow, J. A. E., Kruze, J., Phillips, B. A., Bramley, A. J., & Collins, M. D. (1984). Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*: Description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(4), 467-482.
 - Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & 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*, 2013.
 - Franz, C. M., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 1-24.
 - Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 105-122.
 - Franz, C. M., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 293-310.
 - Garvie, E. I., & Farrow, J. A. (1981). Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 2(4), 299-310.

- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560-3565.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163-171.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 215-222.
- Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food control*, 21(1), 89-96.
- Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay-Laliberté, G., Barbier, G., ... & Chobert, J. M. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4. 1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, 22(12), 2020-2027.
- Hamama, A. (1997). Improvements of the manufacture of traditional fermented products in Morocco: case of jben (moroccan traditional fresh cheese). *Emerging Technology Series—Food Processing Technologies for Africa*. UNIDO, Vienna, 85-102.
- Harboe, M., Broe, M. L., & Qvist, K. B. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking*, 2.
- Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., ... & Sugiyama, K. (2005). Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1475-1476.
- Hosseini, S. V., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1392-1403.
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. T. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 223-233.

- Johnsen, L., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2005). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9243-9250.
- Kayser, F. H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 255-262.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., & Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 269-290.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 123-131.
- Lapointe-Vignola, C. (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait*. Presses inter Polytechnique.
- Leblanc, D. J. (2006). Enterococcus. In *The Prokaryotes* (pp. 175-204). Springer, New York.
- Leclerc, H., Devriese, L. A., & Mossel, D. A. A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(5), 459-466.
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., & Hochman, A. (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and molecular plant pathology*, 40(3), 163-171.
- Lhsaoui, S. (2009). Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire d'Ingénieur, Agronomie.54p
- Liu, S. N., Han, Y., & Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44(3), 643-651.
- Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Balz, R. E. N. A. T. E., Heinz, K., Magrum, L., Woese, C. R., ... & Stackebrandt, E. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Microbiology*, 131(3), 543-551.
- Luquet, F. M., Corrieu, G., & Marteau, P. (2006). Bactéries lactiques et probiotiques. *Acta Endoscopica*, 36(3), 376-376.

- Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1-5.
- Manero A. & Blanch A., (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), 4425-4430.
- Marshall, E., & Mejia, D. (2012). Traditional fermented food and beverages for improved livelihoods. *Diversification booklet*. 79–79.
- Medouni, Y., Boulahchiche, N., & Brahimi, R. (2006). Rôle de la femme rurale dans le système de production agropastoral. Cas de la fraction Ouled Baida de la zone d'El Guedid. Région de Djelfa (steppe centrale). *Options Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens*.
- Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., & Elyachioui, M. (2007). Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2(1), 23-27.
- Mitsui, T., Kasezawa, N., & Goda, T. (2007). Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutrition research*, 27(7), 395-399.
- Monstein, H. J., Quednau, M., Samuelsson, A., Ahrné, S., Isaksson, B., & Jonasson, J. (1998). Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology*, 144(5), 1171-1179.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., & Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. *International Dairy Journal*, 16(8), 867-875.
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.
- Morrison, D., Woodford, N., & Cookson, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of applied microbiology*, 83(S1), 89S-99S.

- Murray, B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clinical microbiology reviews*, 3(1), 46-65.
- Naser, S. M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K., & Swings, J. (2006). Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 413-416.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 113-128.
- Noor-Develiet, P. E., Gist-Brocades, N. N., & Delft, N. C. D. (1983). Les enzymes alimentaires: utilisation et innocuité. *Microbiol. Alim. Nut*, 1, 1-5.
- OMS. (2011). Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6ème Edition, *Organisation Mondiale de santé*, p 191.
- Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters*, 251(2), 267-271.
- Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G., & Reali, D. (1999). Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 258-263.
- Poznanski, E. L. I. S. A., Cavazza, A. G. O. S. T. I. N. O., Cappa, F., & Cocconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International journal of food microbiology*, 92(2), 141-151.
- Ramet, J. P. (1997). La presure et les enzymes coagulantes. In *Le Fromage* (pp. 165-173). Lavoisier Tec and Doc, Paris.
- Sakili, D. & Issoual, D. (2003). Lactic acid bacteria in processing maroccan smen. *Copyright academic d'agriculture de France*, 18 p.

- Salmeron, J., De Vega, C., Perez-Elortondo, F. J., Albisu, M., & Barron, L. J. R. (2002). Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food microbiology*, 19(2-3), 167-174.
- Schaad, N. W. (2001). I. Initial identification of common genera. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.
- Singh, T. A., Devi, K. R., Ahmed, G., & Jeyaram, K. (2014). Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food research international*, 55, 356-362.
- Švec, P., & Sedláček, I. (1999). Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia microbiologica*, 44(1), 3-10.
- Talantikite-Kellil, S. (2015). *Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie* (Doctoral dissertation).
- Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1987). Study of Moroccan dairy products: Iben and smen. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 3(3), 211-220.
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., & Shankar, N. (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2622-2636.
- Thiercelin, M. E. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *CR Soc Biol*, 5(26971.2).
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 318-326.
- Todorov, S. D., Wachsman, M. B., Knoetze, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. (2005). An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(6), 508-513.

- Van Belkum, M. J., & Stiles, M. E. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural product reports*, 17(4), 323-335.
- Vilain, A. C. (2010). Qu'est-ce que le lait?. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127.
- Wigley, R. C. (1996). Cheese and whey in industrial enzymology. *Godfrey and Wiest*, 2, 135-142.
- Yoon, M. Y., Kim, Y. J., & Hwang, H. J. (2008). Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 925-933.
- Zamudio-Maya, M., Narváez-Zapata, J., & Rojas-Herrera, R. (2008). Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential selective medium. *Letters in applied microbiology*, 46(3), 402-407.
- Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., ... & Sonomoto, K. (2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of applied microbiology*, 99(5), 1181-1190.
- Zheng, W., Zhang, Y., Lu, H. M., Li, D. T., Zhang, Z. L., Tang, Z. X., & Shi, L. E. (2015). Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. *BMC biotechnology*, 15(1), 30.

Site Web :

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708> (Consulter le 13/04/2018) .

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708> (Consulter le 25/05/2018).

Annexes

ANNEXE 1 : Tableau de lecture de la galerie API20 Strep (BioMerieux, Marcy l'étoile, France)

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	MIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β -glucosidase (ESCulline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β -naphthylamide	0,0256	PYRroïdonyl Arylamidase	ZYMA + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	0,0376	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GUR	acide naphтол-ASBI-glucuronique	0,0537	β -GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
β GAL	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	0,0306	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphthylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DIHydrolase	Jaune		Rouge	
RIB	D-ribose	1,4	acidification (RiBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
ARA	L-arabinoose	1,4	acidification (ARABinoose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
SOR	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
INU	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
RAF	D-raffinose	3,12	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
AMD	amidon (2)	2,56	acidification (AMIDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

Thème : Isolement et identification préliminaire des entérocoques à partir de produits laitiers fermentés traditionnels : Antibiorésistance ; activité antimicrobienne et hémolytique.

Résumé

La présente étude a pour objectif d'isoler et d'identifier phénotypiquement des souches d'entérocoques à partir de quelques produits laitiers fermentés traditionnels (Lben, Jben, Smen, Klila et Zebda) afin d'évaluer leurs aspects sécuritaires par l'étude de l'antibiorésistance, de l'activité antimicrobienne et hémolytique. Cette étude nous a permis d'identifier 26 isolats dont *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* représentent 58% et 19% du total des bactéries isolées, respectivement. Les résultats du test d'antibiorésistance ont montré une grande sensibilité de toutes les souches d'entérocoques isolées aux antibiotiques testés, en particulier la vancomycine qui est considérée comme un problème de santé majeur dans le monde entier. De plus, aucune réaction hémolytique (γ hémolyse) n'a été détectée dans les 26 souches sélectionnées pour cette étude. L'absence de l'activité hémolytique chez les entérocoques devrait être considérée comme un critère de sélection important pour leur innocuité. Sur les 26 souches d'entérocoques identifiées, 2 souches ont été choisies pour l'étude de l'activité antimicrobienne. Les résultats montrent que les surnageants d'entérocoques testés ont inhibé totalement la croissance de *Penicillium expansum*, tandis qu'une faible inhibition a été observée sur la croissance des *Staphylococcus aureus* et *Fusarium graminearum*. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus parasiticus* ont montré une résistance considérable envers les surnageants d'entérocoques testés. Enfin, cette étude suggère l'évaluation du pouvoir technologique des entérocoques isolés avant l'utilisation de ces bactéries et/ou leurs extraits dans les matrices alimentaires.

Mots clés : *Enterococcus*, Produit laitier fermenté traditionnel, antibiorésistance, activité hémolytique, activité antimicrobienne, Laghouat

داودي آيات فاطمة الزهراء.

الموضوع: عزل وتحديد تمهيداً للكوربات المعوية من بعض منتجات الألبان المخمرة تقليدياً: مقاومة المضادات الحيوية، النشاط المضاد للميكروبات والنشاط الانحلالي الدموي .

تلخيص

الغرض من هذه الدراسة هو عزل وتحديد تمهيداً للسلاطات المعوية للكوربات المعوية من خلال بعض منتجات الحليب المخمرة تقليدياً (السمن، اللبن، الجبن، الزبدة و الكلبيلة) لتقييم جوانب السلامة من خلال دراسة مقاومة المضادات الحيوية، والنشاط المضاد للميكروبات والنشاط الانحلالي الدموي. حددت هذه الدراسة 26 عزلة حيث *Enterococcus faecium* و *E. faecalis* مثلت 58 % و 19 % من مجموع البكتيريا المعزولة، على التوالي. أظهرت نتائج اختبار مقاومة مضادات الميكروبات حساسية عالية لجميع سلالات الكوربات المعوية المعزولة للمضادات الحيوية المختبرة، لا سيما vancomycine الذي يعتبر مشكلة صحية رئيسية في جميع أنحاء العالم. بالإضافة إلى ذلك، لم يكتشف أي تفاعل انحلاي (انحلال دموي γ) في السلالات الـ 26 المختارة لهذه الدراسة. يعتبر عدم وجود نشاط انحلاي في الكوربات المعوية معياراً مهماً لاختيار السلامة. من 26 سلالة للكوربات المعوية التي تم تحديدها، تم اختيار سلالتين لدراسة النشاط المضاد للميكروبات. وأظهرت النتائج أن مستخلصات الكوربات المعوية المجربة ثبتت نهائياً نمو *Penicillium expansum*، في حين لوحظ وجود ضعف تثبيط على نمو *Staphylococcus aureus et Fusarium graminearum*. أظهرت *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Aspergillus parasiticus* مقاومة كبيرة للكوربات المعوية المختبرة. وأخيراً، تقترح هذه الدراسة تقييم القدرة التكنولوجية للكوربات المعوية المعزولة قبل استخدام هذه البكتيريا أو مستخلصاتها في المواد الغذائية.

الكلمات الدالة: الكوربات المعوية، منتجات الألبان المخمرة تقليدياً، مقاومة المضادات الحيوية، النشاط الانحلالي الدموي، النشاط المضاد للبكتيريا، الأغواط.

DAOUDI Ayat Fatima Zohra

Theme: Isolation and identification preliminary of enterococci from some traditional fermented milk products: Antibiotic resistance; antimicrobial and hemolytic activity.

Abstract

The purpose of this study is to isolate and identify phenotypically the *Enterococcus* strains from some traditional fermented milk products (Lben, Jben, Smen, Klila and Zebda) in order to assess their safety aspects through the study of antibiotic resistance, antimicrobial and hemolytic activity. This study identified 26 isolates including *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* accounting for 58% and 19% of total isolated bacteria, respectively. The antimicrobial resistance test results showed a high sensitivity of all isolated to the tested antibiotics, particularly vancomycin which is considered a major health problem worldwide. In addition, no hemolytic reaction (hemolysis γ) was detected in the 26 strains selected for this study. The absence of hemolytic activity in enterococci should be considered as an important selection criterion for their safety. Two out of 26 enterococcal strains were selected for the study of antimicrobial activity. The results show that supernatants of tested enterococci were completely inhibited the growth of *Penicillium expansum*, whereas a weak inhibition was observed on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Fusarium graminearum*. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus parasiticus* showed considerable resistance to the tested enterococci supernatants. Finally, this study suggests the evaluation of the technological potency of isolated enterococci before the use of these bacteria and/or their extracts in food matrices.

Key words: *Enterococcus*, Traditional fermented milk product, Antibiotic resistance, Hemolytic activity, Antimicrobial activity, Laghouat.