

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA

Institut des Sciences et de Technologie

Département de Technologie



MEMOIRE

En vue de l'obtention du **diplôme de MASTER (Académique)**

En : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

M^{elle} HOCINI Meriem

M^{elle} SADOK Nassiba

Intitulé

Valorisation des entérocoques isolés à partir de produits terroir de la wilaya de Naâma et essai de mise en évidence de l'activité des bactériocines (cas du Jben et de Klila)

Soutenu, devant le jury composé de :

Président	Mr GHERIB Mohamed	MCA	CU.Naâma
Encadreur	Mr AMROUCHE Abdel-ilah	Professeur	CU.Naâma
Examineur	Mr SEDDIKI Mohamed	Professeur	CU.Naâma

Session : **Juin 2021**
Promotion : **2020 / 2021**

Remerciements

Avant tout propos, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

A notre promoteur : Mr Amrouche Abdelilah., Professeur au CUN, qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ça bien vaillance, son aide moral et sa disponibilité pendant toute la période de travail. Nos profondes reconnaissances pour vos encouragements votre patience et vos conseils.

A Mr Gherib Mohamed., Maitre de conférences (A) au CUN, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de nos respectueuses reconnaissances.

Nous'adressons également nos remerciements à Mr Seddik Mohamed., Maitre de conférences (A) au CUN, pour nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.

On tient également à témoigner nos profondes gratitudee au directeur et toute l'équipe du laboratoire de contrôle de la qualité et de l'emballage CAQUE de la willaya de Naâma pour leur accueil au sein de leurs laboratoires.

Nos vifs remerciements vont à l'ensemble des ingénieurs et techniciens des laboratoires du centre Universitaire Salhi Ahmed Naâma.

Dédicaces

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leurs amours inestimables, leurs prières, leurs soutiens dans les moments difficiles et leurs encouragements tout au long de mes études. Je vous remercie pour tous ce que vous avez faits et ce n'est jamais suffisant.

A mes chères sœurs Insaf et Asma pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A Meriem et sa famille, chère amie avant d'être binôme pour son entente et sa sympathie.

A mon encadreur Amrouche Abdelilah, qui j'ai longtemps considéré comme un second père, merci d'avoir toujours cru en moi.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer... A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Nassiba

Dédicaces

Avant tout. Nous remercions Dieu qui nous a éclairé le chemin et nous a donné la patience et le courage pour réaliser ce travail, Je dédie ce mémoire à :

La mémoire de ma défunte grand-mère paternelle Fatna BENNACER, que DIEU puisse l'accueillir dans son vaste paradis et mon grand-père Mustapha HOCINI que DIEU vous protège et lui donne une longue vie

Mes grands-parents maternels Rachida AMBOUZZA et Kouider LEBBAD à qui je dois énormément, que DIEU donne la bonne santé.

Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale...À toi très cher papa.

À ma très chère mère LEBBAD Djamilia affable, honorable, aimable, la source de la tendresse de patience inépuisable

Mes frères et ma sœur que j'aime Mustapha, Abdalhadji, Ibrahim et ma jolie Hanane

À mon compagnon de route et à ma merveilleuse amie Nassiba et sa famille Merci pour votre patience et votre amour de votre travail. Je vous souhaite plus de succès et d'excellence.

À mes tantes Meryem et Saadia LEBBAD et ses enfants Hanane et Ilyas merci pour votre présence constante, pour être à mes côtés pour jouer le rôle de mère quand nous en avions besoin.

Toute ma grande famille surtout mes tantes, mes oncles, mes cousins, mes cousines.

À mon cousin et ami Mourad HOCINI, merci pour votre soutien moral, pour m'avoir encouragé à poursuivre mon rêve. Je vous souhaite tout le meilleur

À tous les membres de la famille HOCINI et LEBBAD et BENAOUDA.

À tous mes amis qui m'ont aidé et encouragé à mener à bien ce projet Dallal, Khadra, Fatima.

Meriem

Abstract

The objective of our study is to establish a material safety data sheet characterization of a typical product of the region, in this case Jben by assessing its hygienic status and to see the possibility of isolating lactic bacteria that may have antibacterial potential in relation to opportunistic germs that could pose a health risk to consumers.

The evolution of the qualitative status of the Jben analyzed showed it as a slightly acidic product with water contents around 66.41 to 71.05%. The rate of recorded fat was 15%, which qualifies it as a fresh cheese. The preliminary results of our microbiological investigations on the Jben qualifies it as a very sensitive matrix to the development of microorganisms with a predominant of total aerobic flora, fecal coliforms and some opportunistic germs including *Salmonella*.

In terms of the search for new biological potential, prospecting the different biochemical characteristics of the strains isolated from the Jben demonstrates their belonging to *Enterococcus Faecium* species (% identification by Api strep equivalent to 98.1% and 99.4%) and that 9 isolates out of 12 make part of the same subspecies. The preliminary investigation of the antimicrobial potential of the different isolates was found to be negative and requires a broader and more in-depth study to confirm or deny their biological capacities.

Taking into account the results obtained, Jben is considered as a susceptible matrix and a subject to alteration throughout its manufacturing chain, and therefore needs a restrictive support when handling it in order to preserve its hygienic status (GPH, GMP)

Keywords: Jben, Ewe's milk, *Enterococcus*, bacteriocin.

ملخص

الهدف من دراستنا هو التعريف ووضع وثيقة بيانية لمميزات وخصائص منتوج تقليدي خاص بالمنطقة والتأكد من سلامته من جانب الجودة وأيضاً عزل مجموعة من بكتيريا اللاكتيك التي قد تكون تتمتع بقدرات مضادة للبكتيريا الضارة الانتهازية القادرة على خلق مخاطر صحية للمستهلك.

يظهر تقييم النوعية للجبن الذي تم تحليله على أنه منتوج حامضي مع توفر كمية كبيرة من الماء في الجبن بنسبة 66.44 إلى 71.05% أما بالنسبة إلى معدل الدهون المسجل 15% مما يؤهل المنتوج على أنه جبن كريمي طري.

النتائج الأولية للتحقيقات الميكروبيولوجية على الجبن تؤهله على أنه مادة غذائية حساسة ومعرضة للتلف عن طريق نمو مجموعات بكتيرية كانت الأغلبية مجموعة البكتيريا المتوسطة الحرارة الهوائية تليها نسبة معتبرة من القولونيات البرازية وبعض البكتيريا الانتهازية كالسالمونيلا.

بهدف البحث عن إمكانيات بيولوجية جديدة، عملية التقيب عن خصائص بيوكيميائية مختلفة لسلاسل 12 المعزولة من الجبن بينت انتمائهم إلى النوع المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecium* (بنسبة 98.1-99.4% عن طريق STREP 20 API Galrie) وأن 9 من 12 من البكتيريا المعزولة تنتمي إلى نفس النوع الفرعي. تم إجراء الاستقصاء الأولي للقدرة المضادة للبكتيريا وثبت أنه سلبي ويتطلب دراسة أكبر وأكثر تعمقاً لتأكيد أو إبطال قدرتهم البيولوجية.

بالنظر إلى النتائج المتحصل عليها يعتبر الجبن مادة غذائية حساسة ومعرضة للتلف والتخريب وذلك خلال كل مراحل التصنيع ولذلك يجب علينا أن نكون أكثر حذراً في تحضير المنتج المحلي واحترام قواعد النظافة وشروط التصنيع لحماية السلامة الصحية للمستهلك.

الكلمات المفتاحية: الجبن، حليب الغنم، المكورات المعوية البرازية، بكتريوسينات.

Résumé

L'objectif de notre étude est d'une part essayer d'établir une fiche signalétique de caractérisation d'un produit typique de la région en l'occurrence le Jben par l'évaluation de son statut hygiénique et voir l'éventualité d'isoler des bactéries lactiques pouvant être dotées de potentialités antibactériennes vis-à-vis des germes opportunistes pouvant engendrer un risque sanitaire chez les consommateurs.

L'évaluation du statut qualitatif du Jben analysé le montre comme un produit plus au moins acide avec des teneurs en eau avoisinants 66,41 à 71,05%. Le taux de matière grasse enregistré a été de 15% ce qui le qualifie comme étant un fromage frais à pâte molle. Les résultats préliminaires de nos investigations microbiologiques sur le Jben le qualifie comme une matrice très sensible au développement des germes d'altération avec une prédominance de la FAMT, des coliformes fécaux et certains germes opportunistes notamment les salmonelles.

En matière de recherche de nouvelles potentialités biologiques, la prospection des différents caractéristiques biochimiques des 12 souches isolés à partir du Jben démontre leurs appartenance à l'espèce *Enterococcus faecium* (% d'identification par galeries **API 20 Strep** équivalent à 99,4% et 98,1%,) et que 9 isolats de 12 font partie de la même sous espèce. L'investigation préliminaire des potentialités antibactérienne des différents isolats s'est avérée négative et nécessite une étude plus large et plus approfondie pour affirmer ou infirmer leurs capacités biologiques.

Tenant compte des résultats obtenus le Jben est considéré une matrice susceptible et sujette à l'altération toute au long de sa chaîne de fabrication, et donc a besoin d'une prise en charge restrictive lors de la manipulation pour préserver son statut hygiénique (BPH, BPF).

Mots clés : Jben, lait de brebis, *Enterococcus*, bactériocine.

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
BEA	Bile-Esculine-Azide
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHI	Brain Heart Infusion
BPF	Bonne pratique de fabrication
BPH	Bonne pratique d'hygiène
CT	Coliformes totaux
CTT	Coliformes thermorésistants
C-S	Citrate de Simmons
D°	Degré Dornic
DLC	Désoxycolate
DO°	Densité optique
H	Humidité
MAN	Mannitol
MG	Matière grasse
MOB	Mobilité
PCA	Plate count Agar
PMI	Petit et moyenne industrie
SS	<i>Salmonelle -Shigella</i>
TSE	Tryptone Sel Eau
TSI	Triple Sugar Iron
W_t	Teneur totale en matière sèche

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Situation géographique de la wilaya de Naama	10
Figure 2	Plat traditionnel du Jben et hmira	15
Figure 3	Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers Algériens	15
Figure 4	Méthode traditionnelle de la préparation de Hakka	16
Figure 5	(A) Appareil digestif du poulet ; (B) Complexe stomacal du poulet	17
Figure 6	Présure végétale <i>Cynara cardunculus L</i>	18
Figure 7	Présure végétale <i>Cynara scolymus L</i>	18
Figure 8	Evolution dans le temps des Eucaryotes	21
Figure 9	A : Aspect en microscopie optique (x 1000) d' <i>E. faecium</i> après coloration de Gram. B : Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) d' <i>E. faecium</i>	23
Figure 10	Classification des bactériocines	27
Figure 11	Organisation schématique des objectifs de la recherche	31
Figure 12	<i>Fabrication du Jben à échelle laboratoire</i>	32
Figure 13	Procédé traditionnel de la fabrication du Jben.	33
Figure 14	schématisation de la préparation de la solution mère et des dilutions décimales	37

Figure 15	Résultats des analyses de la flore aérobie mésophile totale des différents échantillons (A : Taux de la flore mésophile totale, B : Flore mésophile sur milieu PCA).	49
Figure 16	Résultats des analyses des Coliformes totaux (CT) et des coliformes thermotolérants (CTT) des différents échantillons (A : Taux des coliformes totaux et thermotolérants, B : croissance des coliformes thermotolérants sur milieu DCL).	50
Figure 17	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative sur milieu Baird Parker	51
Figure 18	Croissance de <i>Salmonelle</i> sur milieu SS	51
Figure 19	Aspects des isolats sur les milieux (A : Citrate Azide, B : BHIA)	53
Figure 20	Caractérisations microscopiques des isolats. A : Observation microscopiques d'état frais ×100 ; B : Observation microscopique de la coloration de Gram ×100.	53
Figure 21	Test de Mannitol Mobilité.	54
Figure 22	Test de Citrate de Simmons.	55
Figure 23	Résultats de l'hydrolyse d'esculine.	55
Figure 24	Résultats du test TSI	56
Figure 25	Résultats de l'identification biochimique par galerie API 20 STREP	58
Figure 26	Test de l'activité antibactérienne d' <i>E.faecium</i> sur <i>Listeria monocytogenes</i> par méthode des disques	59

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Caractéristiques physico-chimiques des laits de diverses espèces animales	7
Tableau 2	Composition du lait de brebis, de vache et de chèvre	8
Tableau 3	Flore microbienne du lait	9
Tableau 4	Répartition des éleveurs et du cheptel par commune	11
Tableau 5	Répartition de la production animale	11
Tableau 6	Enterococcus et leur répartition en groupes d'espèces	22
Tableau 7	Echantillonnage du fromage traditionnel Jben	34
Tableau 8	Les résultats des analyses physicochimiques	47
Tableau 9	Critères microbiologiques du fromage frais	52
Tableau 10	Résultats des tests biochimiques classiques	56
Tableau 11	Résultats de l'identification par galerie API 20 Strep	58

Table des matières

Remerciement	i
dédicace	ii
Abstract	iv
ملخص	v
Résumé	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Table des matières	xi
Introduction générale	1
Partie I	
Synthèse bibliographique	
Chapitre I	
Lait et ses dérivés traditionnels	5
I. Généralités sur le lait	6
I.1. Définition du lait	6
I.2. Caractéristiques de Le lait de brebis	6
I.2.1. Caractéristiques physico chimiques de lait de brebis	6
I.2.2. Caractéristiques chimiques et biochimique du lait de brebis	7
I.2.3. Caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques	8
I.2.4. Microflore de lait	8
a. Flore indigène ou originelle	9
b. Flore contaminante	9
II. Présentation de la wilaya de Naama	9
II.1. Climat	11
II.2. La végétation	12
II.3. Produits laitiers terroirs de la wilaya de Naama	12
II.3.1. Laits fermentés	12
II.3.1.1. Rayeb	12
II.3.1.2. Lben	13
II.3.2. Dérivés laitiers traditionnels	13
II.3.2.1. Zebda Beurre traditionnel	13
II.3.2.2. Smen	13
II.3.3. Fromages artisanaux	13
II.3.3.1. Klila	14
II.3.3.2. Jben	14
II.4. Diagramme de fabrication des produits laitiers Algériens	15
III. Présure	16
III.1. Présure d'origine animale	16
III.2. Présure d'origine végétale	16

Chapitre II	
Les entérocoques	
I. Aperçu sur les bactéries lactiques	19
II. Généralités sur les entérocoques	20
III. Taxonomie	21
IV. Description du genre <i>Enterococcus</i>	22
IV.2. 1. Caractères morphologiques	22
IV.2. 2. Caractères biochimiques et cultureux	23
V. Aptitude technologiques des entérocoques	24
VI. Activité antimicrobienne	25
a. Acides organiques	25
b. Peroxyde d'hydrogène	25
c. Dioxyde de carbone	26
d. Bactériocine	26
VII. Entérocoques des entérocoques	27
a. Mode d'action	28
Partie II	
Etude expérimentale	
Matériels et méthodes	
	30
I. Démarche du travail	31
I.1. Problématique	31
I.2. Objectifs	31
I.3. Diagramme de fabrication du Jben	32
II. Échantillonnage	33
III. Caractérisation du fromage traditionnel Jben	34
III.1. Caractérisations physicochimiques	34
III.1.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)	34
III.1.2. Mesure de l'acidité titrable	34
III.1.3. Détermination de la matière sèche	35
III.1.4. Détermination de teneur en eau (humidité)	35
III.1.5. Détermination de la matière grasse	36
III.2. Caractérisation microbiologique	37
III.2.1. Préparation de la solution mère et les dilutions	37
III.2.2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30°C	37
III.2.3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants	38
III.2.4. Recherche des Salmonelles	39
III.2.5. Recherche des Staphylocoques à coagulase positif	39
III.2.6. Recherche des anaérobies sulfite-réducteurs	39
III.2.7. Dénombrement des moisissures et levures	40
IV. Isolement et purification des entérocoques	40
IV.1. Isolement des entérocoques	40
IV.2. Purification des entérocoques	40

IV.3. Conservation des isolats	41
a. Conservation à court terme	41
b. Conservation à long terme	41
IV.4. Identification biochimique des isolats	41
IV.4.1. Recherche de la catalase	41
IV.4.2. Mannitol mobilité	42
IV.4.3. Utilisation du Citrate	42
IV.4.4. Tolérance au tellurite	42
IV.4.5. Test d'hémolyse	42
IV.4.6. Hydrolyse de l'esculine	42
IV.4.7. TSI	43
IV.4.8. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)	43
V. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène	43
V.1. Méthode de disque	43
V.2. Méthode de diffusion par puits	44
V.3. Recherche de substances inhibitrices de nature protéique	44
Résultats et discussions	
I. Caractérisation du fromage traditionnel Jben	47
I.1. Caractérisations physicochimiques	47
I.2. Caractérisations microbiologiques	48
II. Isolement et identification des isolats	52
II.1. Identification morphologiques des isolats	52
II.1.1 Caractérisations macroscopiques	52
II.1.2. Caractérisations microscopiques	53
II.2. Identification biochimique des isolats	54
II.2.1. Recherche de la catalase	54
II.2.2. Mannitol mobilité	54
II.2.3. Utilisation du Citrate	54
II.2.4. Hydrolyse de l'esculine	55
II.2.5. TSI (Triple Sugar Iron)	55
II.2.6. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)	56
III. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène	58

Conclusion générale
Référence bibliographique
Annexes

Introduction générale

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, mais il est facilement périssable et difficile à conserver, sa transformation en produit laitier lui permet une conservation de longue durée (**BENCHARIF, 2001**). L'homme a longtemps conservé les produits laitiers pendant la période de forte production laitière (hiver). Ainsi, la fabrication des dérivés du lait est un moyen de le conserver, tout en créant un potentiel commercial (**INAYAT & al., 2013**).

En Algérie, la consommation des produits laitiers est une ancienne tradition liée à l'élevage, puisque les produits laitiers sont fabriqués selon des d'anciens procédés artisanaux, en utilisant du lait ou des mélanges de lait de différentes espèces (**SHORI, 2017 ; BOUDALIA & al., 2018 ; BOUSBIA & al., 2017**). Il existe une grande variété de produits laitiers artisanaux, leur dénomination ainsi que leur processus de fabrication diffèrent d'une région à une autre. Ces produits diffèrent également par leur goût et leur consistance (**LEKSIR & al., 2019**). Les plus populaires d'entre eux en Algérie sont le Jben, le Lben, la Klila, le Rayeb et le Bouhazza (**GUETOUACHE & al., 2015**).

Le Jben est un fromage frais connu et populaire sur le territoire Algérien produit à partir du lait cru de vache, de brebis ou de chèvre, spontanément acidifié ou coagulé par des enzymes coagulantes à l'aide de plantes, ou présure animale ou starters acidifiants (**OUDGHIRI & al., 2005 ; HAYALOGU, 2017**). Le Jben fabriqué à partir du lait non pasteurisé, se caractérise par une matière sèche totale d'environ 35% et un pH inférieur à 4,5 (**GUETOUACHE & al., 2015**).

Les bactéries lactiques sont très répandues dans la nature et prédominent dans la microflore du lait et de ses produits. Elles sont surtout connues dans la préparation des laitages fermentés, mais également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin. De par leurs différentes propriétés technologiques, elles contribuent à la texture, ainsi qu'à la flaveur des aliments, notamment par la production de composés aromatiques (**AYAD & al., 2004 ; HAMMI, 2017**). Certaines souches de bactéries lactiques peuvent augmenter la sécurité et la qualité des produits fermentés grâce à la production de différents composés antimicrobiens, ces propagules microbiennes peuvent empêcher la croissance des germes d'altération et des bactéries pathogènes. Les métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques comprennent les acides organiques, le peroxyde

d'hydrogène, le diacétyl et également des métabolites supplémentaires tels que les peptides nommés bactériocines (**AHMADOVA & al., 2012**).

Parmi ce groupe de bactéries les espèces du genre *Enterococcus* sont présentes dans de nombreux produits alimentaires, notamment d'origine animale, tels que les produits fermentés (**ORUC & al., 2021**). Les espèces les plus fréquentes appartenant au genre *Enterococcus* présentes dans les produits laitiers sont *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* (**GAGLIO & al., 2016**). Beaucoup de bénéfices ont été attribués à ces bactéries, comme leur contribution aux caractéristiques sensorielles des fromages, leurs propriétés probiotiques et production de substances antimicrobiennes (**CARLOS & al., 2010**), pour ces raisons et leurs capacité de survivre dans des conditions environnementales hostiles telles que la salinité, les températures et les pH extrême (**NIETO-ARRIBAS & al., 2010**) les *Enterococcus* sont impliqués dans la transformation des aliments.

Dans le cadre de la valorisation des produits artisanaux et de dresser la visibilité des richesses de la région nous avons suggéré à réaliser une étude qui vise à étudier en premier lieu le profil physico-chimique et microbiologique du fromage artisanal Jben issu du lait de brebis de la région de Naâma Sud-ouest Algérien. En deuxième lieu, il a été question de recherche et d'isoler les entérocoques typiques de ce produit terroir pour une éventuelle caractérisation de leur capacités biochimiques et de mettre en évidence leur potentialités antimicrobiennes notamment celle antibactériennes contre des souches responsables du risque sanitaire (altération, pathogénicité) chez le consommateur.

Partie I

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : lait et ses dérivés traditionnels

Chapitre II : Les entérocoques

Chapitre I

Laits et ses dérivés traditionnels

I. Généralités sur le lait

I.1. Définition du lait

Le lait est un liquide alimentaire, opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à odeur peu marquée et un gout douceâtre, sécrété par les glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre, et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**MARCEL, 2007**). D'après le congrès international de la répression des fraudes de 1909, le lait est le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (**KHOUALDI, 2017**).

Le lait est un aliment complet mais d'un point de vue physicochimique, c'est un produit très complexe. La connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensables à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (**KHOUALDI, 2017**).

Le lait de brebis a été toujours considéré comme un lait ayant des caractéristiques spécifiques et, dans certains cas, comme étant un produit plus noble que les autres laits (**LUQUET, 1986**). Comme pour les autres ruminants, la production et la composition du lait des brebis laitiers sont principalement conditionnées par les facteurs génétiques, le stade de lactation, le système de traite et l'aliment (**HENNI, 2011**). Ce type de lait a des caractéristiques différentes que les autres laits, grâce à sa forte viscosité impliquant sa richesse. Comme il présente une opacité blanche plus marquée que celle des laits de vache et de chèvre et il est particulièrement riche en composants fromagères.

On prépare en moyenne deux fois plus de fromage avec du lait de brebis qu'avec du lait de vache (**HENNI, 2011**).

I.2. Caractéristiques du lait de brebis

I.2.1. Caractéristiques physico chimiques du lait de brebis

Certaines caractéristiques physico-chimiques du lait notamment le pH, l'acidité titrable renseignent sur la qualité hygiénique du lait. D'autres comme le point cryoscopique et la densité permettent de détecter les fraudes (**BELDJILALI, 2015**).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des laits de diverses espèces animales (HENNI, 2011).

Constante	Vache	Chèvre	Brebis
Energie (Kcal/lite)	705	600-750	1100
Densité du lait entier à 20°C	1.028-1.033	1.027-1.035	1.034-1.039
Point de congélation (°C)	0.520-0.550	-0.550- -0.583	-0.570
pH-20°C	6.60-6.80	6.45-6.60	6.50-6.85
Acidité titrable (Dornic)	15-17	14-18	22-25
Tension superficielle du lait entier à 15°C (dynes cm)	50	52	45-49
Conductivité électriques à 25°C (siemens)	45×10 ⁻⁴	43-56 ×10 ⁻⁴	38 ×10 ⁻⁴
Indice de réfraction	1.45-1.46	1.35-1.46	1.33-1.40
Viscosité du lait entier à 20°C (centpoises)	2.0-2.2	1.8-1.9	2.86-3.93

1.2.2. Caractéristiques chimiques et biochimique du lait de brebis

Lait frais de brebis varie en fonction de plusieurs facteurs (l'alimentation, le stade de lactation, la parité, la saison, la température ambiante, le mode de la traite, et l'âge de l'animal) Selon ces auteurs, elle peut varier aussi avec les races et l'état sanitaire de l'animal. Des variations saisonnières affectent fortement la composition en acide gras en raison des changements de la composition de fourrage d'animaux alimentés (BELABBES, 2019).

Tableau 2 : Composition du lait de brebis, de vache et de chèvre (BELABBES, 2019)

Paramètre (g/100g lait)	Lait de brebis	Lait de chèvre	Lait de vache
Teneur en eau	82.9 ± 1.4	87.6 ± 0.7	87.9 ± 0.5
Matières grasses	5.9 ± 0.3	3.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2
Cendres	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Lactose	4.8 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.7 ± 0.4
Protéines	5.5 ± 1.1	3.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Caséines	4.7 ± 0.5	2.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1

1.2.3. Caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques

Lait de brebis est une excellente source en nutriments pour l'alimentation humaine, avec une meilleure performance que le lait de vache pour apporter les dix acides aminés essentiels. Il apporte aussi des quantités appréciables de calcium, de phosphore et de riboflavine, et les acides gras souhaités en quantité et en qualité. Il est aussi mieux accepté pour remplacer le lait de vache en cas d'allergie à ce dernier (BENDIMERAD, 2013).

Le lait de brebis permet également la fabrication de laits acidifiés. Il existe un grand nombre de variétés de fromage au lait de brebis susceptibles d'être maturés de façon très différentes. De nos jours, dans tous les pays méditerranéens, ce lait est employé soit pour la fabrication d'un caillé blanc mûri et conservé dans la saumure, soit pour faire des fromages pressés, ou à moisissure interne. Certains ont acquis une réputation mondiale (BELDJILALI, 2015).

1.2.4. Microflore de lait

La microflore de lait cru est très diversifiée selon son origine, elle se divise en flore originelle (indigène) et une flore de contamination (BELDJILALI, 2015).

Tableau 3 : Flore microbienne du lait (BOUADJAIB, 2013)

Flore originelle		Flore de contamination	
Bactéries des canaux galactophores	Bactéries contaminates du lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présents sur l'animal malade
<i>Lactobacilles</i> <i>Streptocoques lactiques</i>	<i>Pseudomonas/Flavobacterium</i> <i>Entérobactéries/ Microcoques</i> <i>Corynébactéries/ Bacillus</i> <i>Streptocoques faecalis et Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Coliformes thermo-tolérants/Salmonella</i> <i>Yersinia</i> <i>Compylobacter</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella et Yersinia</i>

a. Flore indigène ou originelle

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptique, il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml .la flore autochtone des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes, plus ou moins abondants, ces microorganismes sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et autres facteurs (KABIR, 2015).

b. Flore contaminante

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut être composée d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (KABIR, 2015).

II. Présentation de la wilaya de Naama

La wilaya de Naâma se compose de sept (07) daïras regroupant douze (12) communes, elle s'étend sur une superficie de 29.514,14 Km² avec une population estimée au 31/12/2016 à 268 721 habitants, soit une densité de 9.01 hab/Km² (DSA, 2016).

La wilaya de Naâma est située dans la zone frontalière avec le royaume du Maroc, elle est située entre l'Atlas tellien et saharien dans sa partie occidentale, elle occupe une superficie de 2.951.410 ha Limitée au :

- Nord : par les Wilayas de Tlemcen et Sidi belabbes.
- Sud : par la Wilaya de Bechar.
- L'est : par la Wilaya d'El-Bayadh
- L'ouest : Par le Royaume du Maroc.

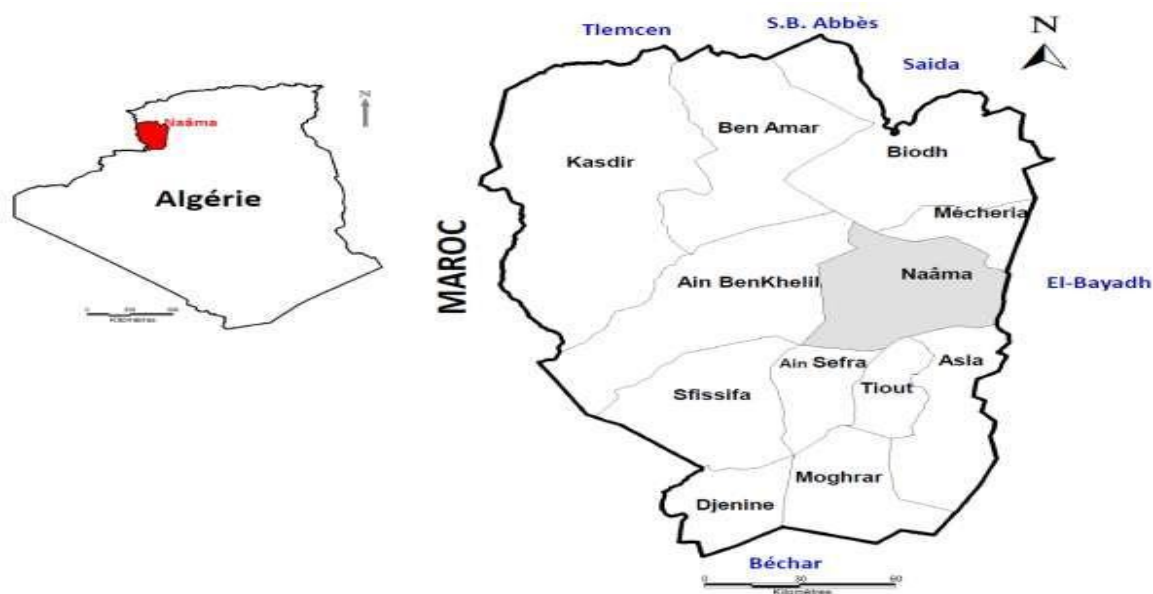


Figure 01 : Situation géographique de la wilaya de Naama (BOUCHERIT, 2018)

La pratique de l'élevage constitue l'activité de base d'une grande partie de la population rurale, vu la vocation pastorale de la wilaya du Naama. Les statistiques datant de 2016 des services agricoles de la wilaya de Naâma indiquent sur le **Tableau 4**, rapportent que, 6700 éleveurs exercent cette activité avec un cheptel de 1 526 076 têtes dont près de 92 % ovin. Le système de conduite du cheptel ovin le plus courant dans la région est le système pastoral ou semi-pastoral (DSA, 2016).

L'activité pastorale est traduite par une production animale caractérisée par une diversité de produits dont la viande rouge demeure le produit principal (**Tableau 5**).

En matière de transformation, malgré l'importance de son cheptel (plus de 1 500.000 tête), la wilaya n'a pas connu une promotion de la PMI (petite et moyenne industrie) en aval des activités d'élevage (abattage industriel, chaîne de froid, production de viandes, production et transformation de la laine, production des cuirs et peaux, tannage et fabrication de produits finis et semi-finis,...), à l'exception de deux unités de conditionnement de lait située à Ain Sefra et Mecheria (DSA, 2016).

Tableau 4. Répartition des éleveurs et du cheptel par commune (DSA, 2016)

Commune	Éleveurs		Cheptel				Total
	Nombre	%	Ovin	Bovin	Caprin	Camelin	
Naâma	699	10,43	110 640	3 841	6 842	50	121 810
Mecheria	250	3,73	49 935	2 364	3 305	0	55 933
Ain-Sefra	550	8,21	85 675	2 985	5 447	11	94 753
Tiout	315	4,70	76 679	927	4 871	105	82 970
Sfissifa	919	13,72	123 261	3 247	7 646	0	134 635
Moghrar	146	2,18	30 591	273	3 304	432	34 903
Asla	702	10,48	104 193	1 565	6 523	435	113 154
Dj. –Bourezg	64	0,96	18 142	99	2 252	15	20 693
Ain-Ben-Khelil	1178	17,58	215 329	6065	13 100	0	234 751
M. Ben Amar	388	5,79	178 140	5 902	10 875	0	195 039
Kasdir	624	9,31	227 081	3 819	7 866	0	238 937
El-Biodh	865	12,91	180 334	6 518	10 955	0	198 498
Total	6 700	100%	1 400 000	37 605	82 986	1 048	1 526 076
Pourcentage	-	-	91.74%	2.46%	5.44%	0.07%	100%

Tableau 5. Répartition de la production animale (DSA, 2016)

Désignation	Total
Viande rouge (Qx)	29 699
Viande blanche (Qx)	14 723
Lait (L)	41 076 987
œufs (1000 unités)	988
Laine (Qx)	12 860
Miel (Kg)	78
Peaux (Qx)	2 546

II.1. Climat

Les températures moyennes annuelles ont une influence considérable sur l'aridité du climat. Dans les hautes plaines sud oranaises, les températures varient normalement dans l'année, élevées en saison estivale et basses en saison hivernale. Le mois de janvier reste le mois le plus froid de l'année et le mois de juillet est le mois le plus chaud pour les stations de la région. La température moyenne maximale est de 35.1 °C et de 37.6 °C à Mecheria et à Ain sefra respectivement (BENSAID, 2006).

II.2. Végétation

La végétation naturelle de la wilaya de Naama est caractérisée par une physionomie de steppe sauf dans les montagnes où subsistent les restes de forêts primitives abattues par l'homme à base de *Pinus Halepensis* et *Juniperus phoenicea*. En dehors de ces espèces forestières, l'aspect de la steppe change avec le gradient pluviométrique et la nature du sol. La steppe sud Oranaise est dominée par les formations végétales suivantes (**BENSAID, 2006**) :

- Steppe à alfa (*Stipa tenacissima*) ;
- Steppe à armoise blanche (*Artemisia herba Alba*) ;
- Steppe à sparte (*Lygeum spartum*) ;
- Steppe à halophytes ;
- Steppe à psamophyte.

II.3. Produits laitiers terroirs de la wilaya de Naama

L'indication de l'origine d'un produit alimentaire du terroir est interprétée comme un signe de qualité par les consommateurs, qui attribuent aux produits terroirs différentes significations, notamment symboliques. Certaines dimensions liées à l'origine du produit ont été largement étudiées, d'autres caractéristiques potentielles du territoire d'origine restent à explorer pour cerner ce qui est créateur de valeur aux yeux des consommateurs dans un produit terroir (**KREZIAK, 2010**).

L'augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de sa conservation sous la forme fraîche a conduit au développement des technologies de productions traditionnelles. La transformation du lait en produits laitiers traditionnels algériens fait partie intégrante de l'héritage et a une grande importance culturelle médicinale et économique (**LAHSAOUI, 2009**).

II.3.1. Lait fermentés

II.3.1.1. Rayeb

Ou raib est du lait caillé, traditionnellement obtenu après acidification spontanée à température ambiante du lait cru durant une période variant de 24h à 72h selon la saison. Le rayeb est consommé tel quel ou transformé (**MAHAMED, 2015**).

La fermentation du rayeb est associée à des bactéries lactiques mésophiles appartenant aux Leuconostokes présents naturellement dans les laits crus mis en œuvre. De nos jours, la fermentation spontanée lente, est remplacée par une fermentation plus rapide par des bactéries lactiques thermophiles apportées sous forme de levains (MAHAMED, 2015).

II.3.1.2. Lben

Lben est l'un des produits très connus de transformation artisanale du lait de l'Algérie. La préparation du lben début par coagulation en Rayeb pendant 24h à 72h selon la saison, le rayeb peut être consommé tel qu'il est ou subir un barattage et un écrémage dans une peau de chèvre ou de brebis appelé « chkoua » ou « kerba ». La peau de l'animal non fondue est tannée puis confectionnée sous forme de sac imperméable par nouaison des différentes ouvertures (MAHAMED, 2015).

II.3.2. Dérivés laitiers traditionnels

II.3.2.1. Zebda Beurre traditionnel

Le beurre frais ou zebda est obtenu après barattage du rayeb. Ce dernier est augmenté par une quantité d'eau tiède au cours du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre. Les globules gras apparaissant en surface sont séparés par une cuillère perforée (DEROUICHE, 2017).

II.3.2.2. Smen

Préparé dans plusieurs pays. Il est connu comme smen au Maroc (BENKERROUM & TAMIME, 2004). Le surplus du beurre produit est transformé en beurre ranci ou smen par lavage du beurre frais à l'eau tiède, puis le salage (BENKERROUM & TAMIME, 2004). Au cours de la période de maturation, le beurre cru subit des changements biochimiques conduisant à sa transformation en smen. Une protéolyse des protéines du lait résiduel dans la phase aqueuse peut se produire. La lipolyse est le principal mécanisme qui détermine la saveur du produit, et cette activité pourrait provenir des cellules microbiennes et/ou des lipases libres. L'oxydation chimique contribue aussi dans une moindre mesure à la saveur du smen (DEROUICHE, 2017).

II.3.3. Fromages artisanaux

Les fromages, tout particulièrement ceux traditionnels, bénéficient d'une place incontournable parmi les différentes préparations alimentaires. Cette tradition de

fabrication englobe non seulement le savoir-faire des différentes générations mais aussi un mariage intime entre la terre et les animaux laitiers, d'où la nécessité de préserver cette tradition dans son environnement naturelle (AISSAOUI, 2014).

II.3.3.1. Klila

La Klila est un fromage fermenté à pâte dure produit empiriquement dans plusieurs régions de l'Algérie. Il est fabriquée par un chauffage relativement modéré (entre 55 et 75°C) du Lben jusqu'à l'obtention d'un coagulum (entre 10 et 15 minutes) et sans utilisation de culture starter. Le coagulum peut être consommé tel qu'il est après égouttage naturel ou à l'aide d'une pierre (fromage frais) ou bien, il peut subir un découpage et séchage (réhydratation de 2 à 15 jours selon la saison) et peut être utilisé comme un ingrédient dans les préparations culinaires traditionnelles. La Klila se conserve plusieurs années à température ambiante sous sa forme déshydratée dans des jarres en poterie ou en verre ou bien dans des sacs en peau de chèvre ou de mouton (AMIMOUR, 2019).

II.3.3.2. Jben

Le Jben est un fromage frais préparé traditionnellement dans plusieurs régions de l'Algérie notamment dans les zones rurales. Plusieurs techniques de fabrication sont utilisés pour préparer le Jben ce qui aboutit à des produits aux caractéristiques très variées. Sa fabrication traditionnelle comporte une étape d'acidification spontanée du lait cru de vache, de brebis ou de chèvre à température ambiante suivi d'une coagulation par le biais d'addition d'un agent coagulant autochtone d'origine végétale (exemple : fleurs de chardon, d'artichaut) ou d'origine animale (exemple : Caillette, proventricules). Le salage peut avoir lieu après égouttage le caillé obtenu (AMIMOUR, 2019).

Le Jben contient une microflore variée qui constitue une ligne de défense par la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines. Ce fromage a un goût salé, légèrement acide et ses propriétés organoleptiques sont agréables. Il est consommé soit tel qu'il est, ou après un séchage afin de prolonger sa durée de conservation (DEROUICHE, 2017).

La consommation du Jben dans la wilaya de Naama est variée selon la région, l'événement et les saisons.



Figure 2 : Plat traditionnel du Jben et hmira (HOCINI & SADOK, 2020)

II.4. Diagramme de fabrication des produits laitiers Algériens

En Algérie, les produits laitiers traditionnels, en particulier les types fermentés, ont fait la fierté de tradition culinaire pendant longtemps. Il est évident que ces produits ont joué un rôle majeur dans l'alimentation des communautés de la région rurale. La technologie traditionnelle occupe une place importante dans la transformation artisanale du lait frais. Toutefois, les variétés traditionnelles algériennes n'ont pas été étudiées de façon exhaustive et ils sont caractérisés par une fabrication traditionnelle à l'échelle familiale. Le plus souvent, les produits laitiers traditionnels servent à l'autoconsommation ; le surplus pouvant être vendu (DEROUICHE, 2017).

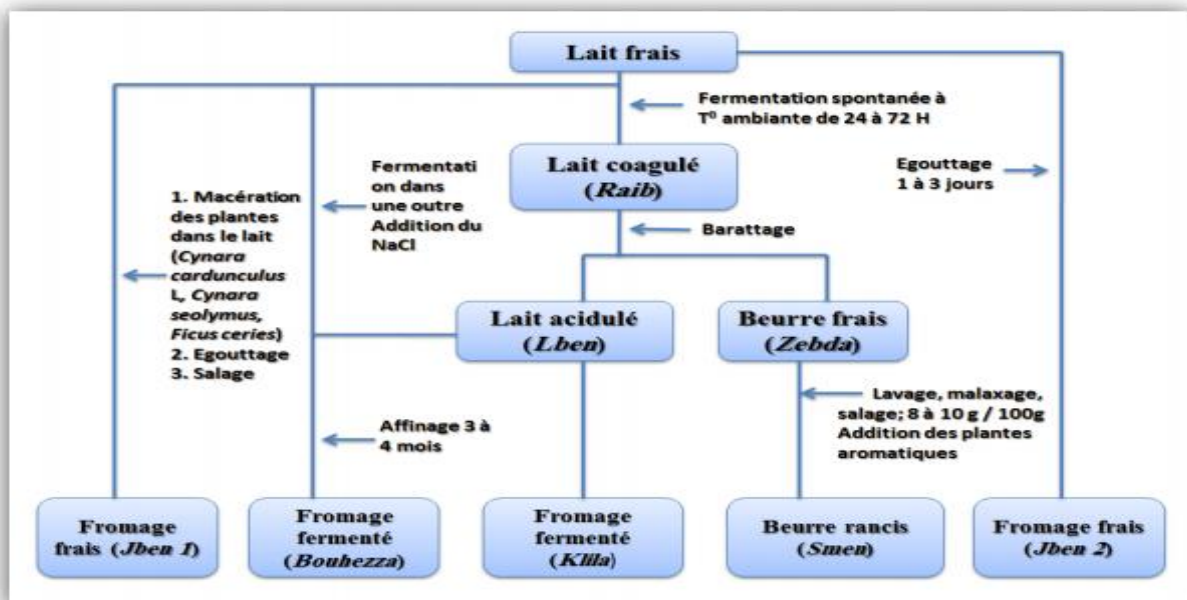


Figure 3 : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers Algériens (LAHSAOUI, 2009).

III. Présure

III.1. Présure d'origine animale

Dans la fabrication traditionnelle du Jben, les femmes algériennes utilisent souvent la caillette de jeunes ruminants, Il s'agit de la quatrième poche de l'estomac des veaux, des chevreaux et d'agneaux qui ne boivent que du lait à leur naissance (ruminants non sevrés). La caillette est récupérée, rincée à l'eau puis saupoudrée avec du sel. Par la suite, les deux extrémités sont bouchées et la caillette est séchée à l'air libre pendant des périodes variantes de 15 jours à 1 mois selon la saison. La caillette séchée est découpée en morceaux puis conservée pendant 6 mois (AMIMOUR, 2019).

La caillette possède des glandes digestives avec une muqueuse sécrétrice. Elle se caractérise de plusieurs replis disposés à la manière de valvules qui s'opposent au reflux des aliments. L'enzyme responsable de la coagulation du lait par la caillette est la présure. Cette dernière renferme deux protéases gastriques actives à pH acide (protéases acides) la chymosine (avec effet coagulant) et la pepsine. La chymosine est sécrétée principalement dans le fœtus et l'estomac des nouveaux nés, et son taux diminue graduellement jusqu'à ce qu'elle devienne absente chez l'adulte (AMIMOUR, 2019).

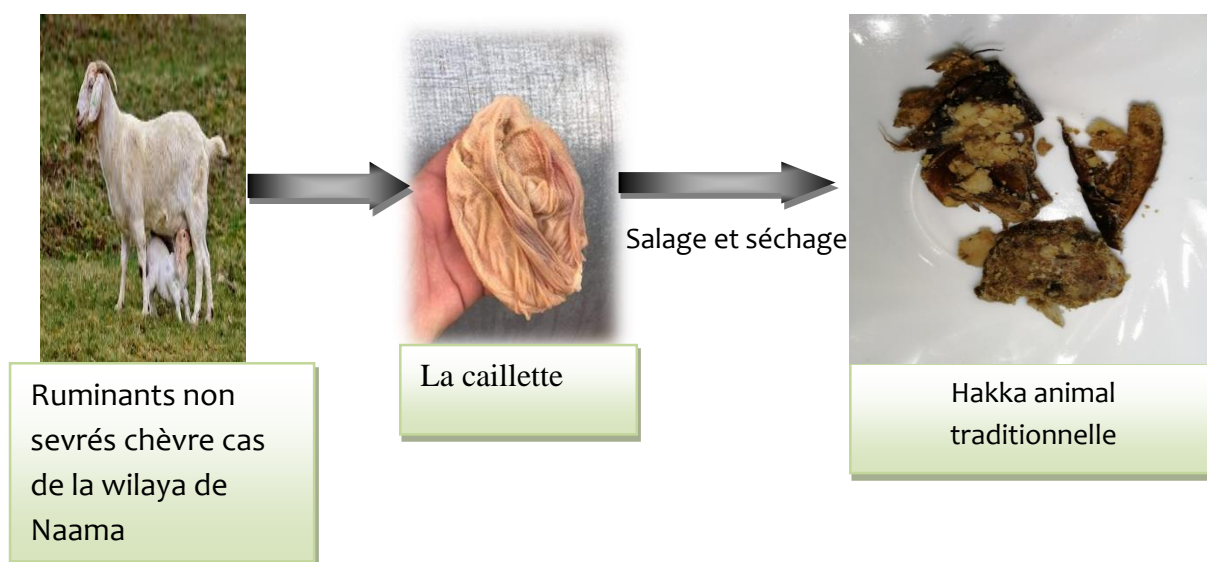


Figure 4 : Méthode traditionnelle de la préparation de Hakka

Les femmes ont commencé à utiliser d'autres substances à caractère coagulant (agents coagulants autochtones) comme substituant de la présure. Il s'agit de la couche du Kaolin du gésier de poulet et le proventricule du poulet ou ventricule succenturié. La couche du kaolin est de forme cornée et plissée et est localisée dans la face interne du gésier de poulet. Le proventricule de poulet de nature glanduleuse est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé entre le jabot et le gésier, ces deux agents coagulants sont récupérés du tube digestif de poulet, rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliments adhérentes après être coupé par incision longitudinale à l'aide d'un couteau. Les couche de Kaolin et les proventricules nettoyés subissent ainsi un séchage à l'air libre pendant des périodes variantes (environ 3jours et 15jours respectivement) et sont conservés pendant deux mois à température ambiante. Les proventricules peuvent être conservés directement après nettoyage au congélateur (-18°C) (AMIMOUR, 2019).

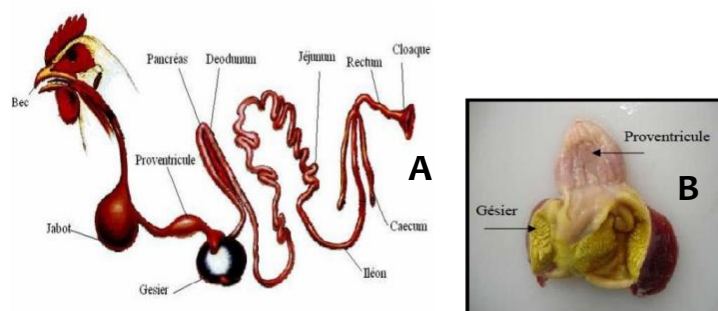


Figure 5 : (A) Appareil digestif du poulet ; (B) Complexe stomacal du poulet (LARBIER & LECLERCQ, 1992).

III.2. Présure d'origine végétale

El Hekka (présure végétale) est un agent coagulant du lait d'origine végétale est utilisé pour la fabrication traditionnelle du Jben en Algérie. Cet agent nommé El Hekka est représenté par les fleurs de chardons et les fleurs d'artichaut. Ces dernières sont cueillies et séchées à l'air libre puis conservées. Le lait utilisé pour la coagulation est le lait de brebis ou de chèvre (AMIMOUR, 2019). La variété végétale utilisée varie d'une région à l'autre ; elle donne un goût et une texture appréciée par les gens de la région concernée (MAHAMED, 2015).

a) Le chardon (*Cynara cardunculus* L)

Il Pousse sur les sols argileux dans des endroits pierreux. Le chardon est utilisé pour coaguler principalement le lait de brebis. Son utilisation dans le lait de vache provoque une modification de texture et de goûts (plus acide et amer) des produits laitiers du fait de son activité protéolytique non coagulante élevée (AMIMOUR, 2019).



Figure 6 : Présure végétale *Cynara cardunculus* L

b) L'artichaut (*Cynara scolymus* L)

Il possède les mêmes propriétés coagulantes que le chardon dont leur activité coagulante résulte de la présence des protéinases aspartiques à caractère acide qui rompe la liaison phénylalanine¹⁰⁵-méthionine¹⁰⁶ de la caséine-k. Ces protéinases appelées cardosine A et cardosine B possèdent des caractéristiques et activités similaires de la chymosine et la pepsine (AMIMOUR, 2019).



Figure 7 : Présure végétale *Cynara scolymus*

Chapitre II
Les entérocoques

I. Aperçu sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bacilles à Gram positif qui sont largement utilisés dans la production commerciale d'aliments fermentés, en plus de produire des saveurs, des odeurs, des textures et des changements dans les aliments, elles sont également connus pour leur effet antagoniste contre des bactéries pathogènes. L'acide lactique est le principal métabolite produit par ces bactéries (SOUZA & al., 2017).

Les bactéries lactique sont généralement catalase négatif, microaérophile, organotrophes strictement fermentatives, acido-tolérantes, non sporulantes, regroupant ainsi des bactéries caractérisées par leur morphologie, leur physiologie et leur métabolisme (OUWENHAND & al., 2002).

Les bactéries lactiques regroupent plusieurs espèces dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus* et *Carnobacterium* (AXELSSON, 2004).

II. Généralités sur les entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries omniprésentes dans la flore intestinale normale chez les humains et les animaux, et sont fréquents dans les environnements contaminés par l'homme et les matières fécales animales (FRANZ & al., 1999). Ils font partie des groupes de bactéries les plus présentes dans de nombreux produits fermentés (ORHAN ORUC & al., 2021), et dans les produits finis issues de l'industrie agro-alimentaire ceci est due à leur résistance aux traitements thermiques industriels (les températures de pasteurisation) et leur grande adaptation aux conditions environnementales (FOULQUIE & al., 2006) , leur présence et croissance dans les aliments fermentés tels que les fromages et les saucisses donnent des résultats organoleptiques des produits uniques, qui contribuent à la cuisine locale et patrimoine de la région (FRENZ & al.,2003). Les entérocoques ne sont pas considérés comme des pathogènes primaires, mais en raison de leur capacité d'acquérir

une résistance élevée aux agents antimicrobiens, ils sont apparus comme pathogènes nosocomiaux dans le monde entier (LINDEN & MILLER, 1999).

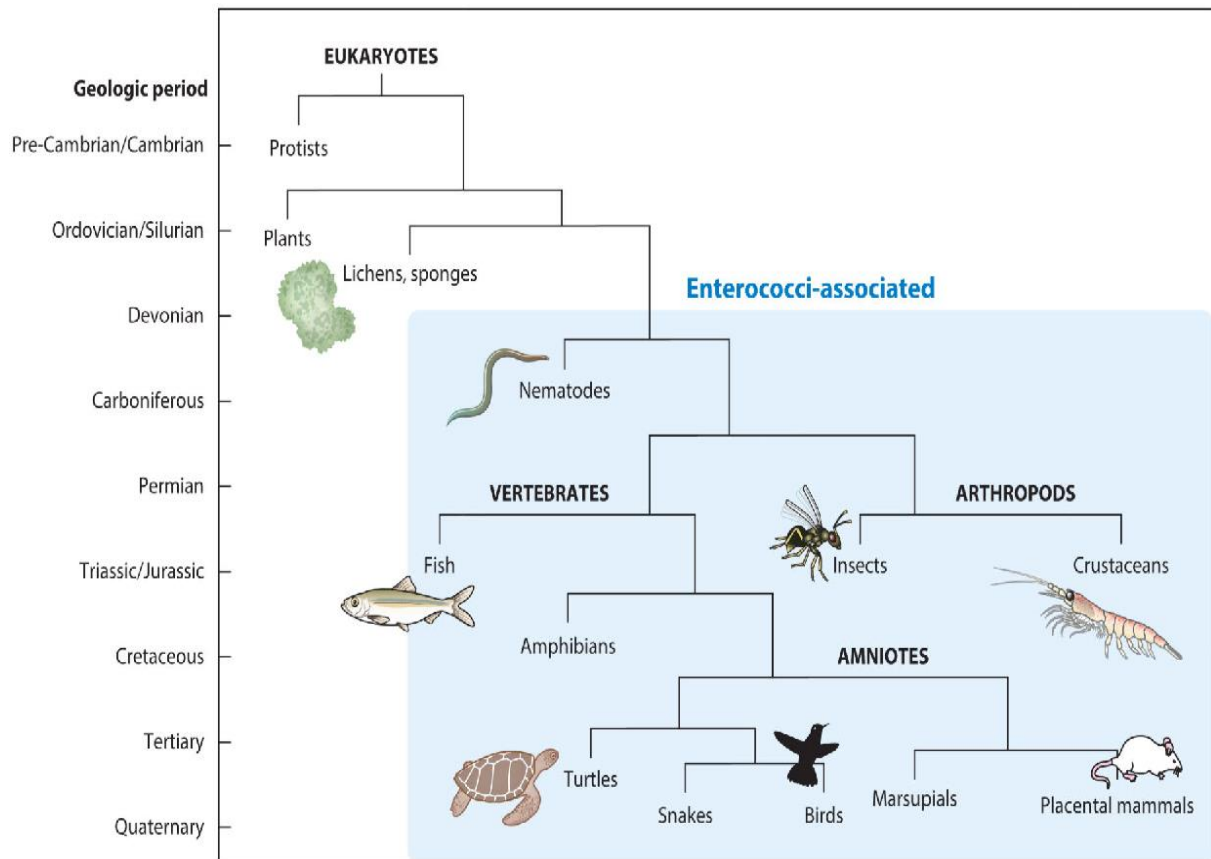


Figure 8. Evolution dans le temps des Eucaryotes (VAN TYNE & GILMORE, 2014).

Le rectangle bleu correspond aux espèces chez lesquelles le portage intestinal d'entérocoques est avéré.

L'échelle des ordonnées correspond aux ères géologiques.

III. Taxonomie

« Le terme entérocoque a été utilisé la première fois par **THIERCELIN (1899)** pour décrire un diplocoque Gram-positif d'origine intestinale qui se présente sous forme de paires ou en petites chainettes, ce microorganisme a été inclus dans le genre *Streptococcus* comme *Strep. faecalis* par **Andrewes & Horder (1906)**, une deuxième espèce fécale décrite comme *Strep. faecium* par (**Orla-Jensen, 1919**) a été trouvée pour avoir des caractéristiques similaires» (**BOUSSOUAR, 2015**), il a fallu attendre 1984 et des expériences d'hybridation ADN-ADN ainsi que l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et de *sodA* pour montrer que les espèces *Strep. faecium* et *Strep. faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus* (**SCHLEIFER & al., 1984**).

Selon le **Bergey's manuel** de la bactériologie systématique, la deuxième édition publiée en **2009**, le genre *Enterococcus* est classé dans la famille *Enterococcaceae*, ordre *Lactobacillales*, classe des *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Au cours des dix dernières années, le genre a été élargi et 54 espèces d'entérocoques sont actuellement reconnus (**Euzeby, 1997 ; dernière mise à jour totale 7 novembre 2014**).

Tableau 6 : Enterococcus et leur répartition en groupes d'espèces (Bergey's Manual, 2009)

Groupes d'espèce basée sur la similarité du gène de l'ARNr 16S	Espèces
Groupe <i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. pseudoavium</i>
Groupe <i>E. caecorum</i>	<i>E. caecorum</i> , <i>E. columbae</i>
Groupe <i>E. italicus</i>	<i>E. italicus</i> , <i>E. camelliae</i>
Groupe <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. caccae</i> , <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i> , <i>E. silesiacus</i> , <i>E. termitis</i>
Groupe <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. ratti</i> , <i>E. villorum</i>
Groupe <i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
Groupes phylogénétiquement distincts	<i>E. camelliae</i> , <i>E. aquimarinus</i> , <i>E. asini</i> , <i>E. canintestini</i> , <i>E. dispar</i> , <i>E. hermanniensis</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. saccharolyticus</i> , <i>E. sulfureus</i>

IV. Description du genre *Enterococcus*

IV.1. Caractères morphologiques

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif immobiles (sauf *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* qui sont mobiles à 30°C), non capsulés, disposés en paires ou en courtes chaînettes. Les bactéries peuvent prendre un aspect coco-bacillaire quand la coloration de Gram est effectuée à partir de colonies sur gélose (**CHRISTOPHE, 2017**).

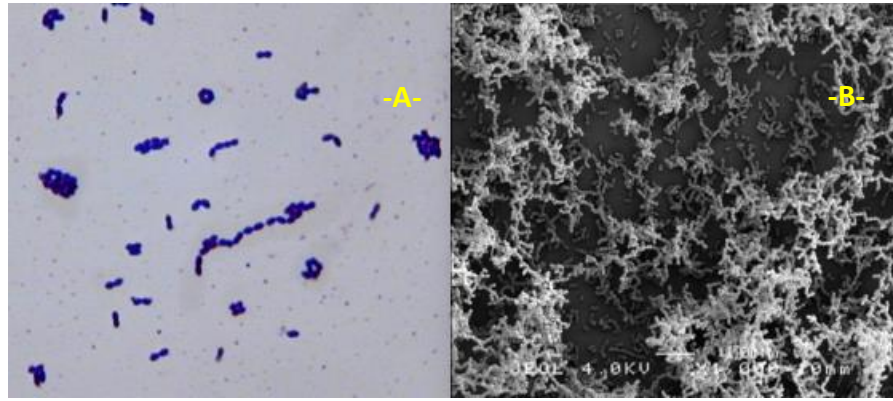


Figure 9 : -A- : Aspect en microscopie optique (x 1000) de *E. faecium* après coloration de Gram. -B- : Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) de *E. faecium* (CHRISTOPHE, 2017).

IV.2. Caractères biochimiques et culturels

Les entérocoques sont généralement anaérobies facultatifs, catalase négative, oxydase positive (LAZRAG, 2017) mais certaines espèces possèdent une activité pseudo-catalase (GALVEZ & al., 2012). Les entérocoques peuvent croître de 5-10°C à 45-50°C, en aérobie et anaérobie, *E. faecium* et *E. faecalis* peuvent survivre à un chauffage à 60 °C pendant 30 minutes, ainsi qu'à une gamme de valeurs de pH entre 4,6 et 9,9. Elles peuvent tolérer la présence de sels biliaires jusqu'à 40% (p/v). *E. faecalis* est capable de se développer dans 6,5% de NaCl (VERMA & KALYAN, 2018).

Ce sont des chimio-organotrophes, ont un métabolisme fermentaire, de type homofermentaire ou le produit final prédominant de la fermentation du glucose est la L (+) - acide lactique. Les entérocoques font partie d'un groupe de microorganismes nommés bactéries à acide lactique produisant des bactériocines. Une de leurs caractéristiques consiste en un faible contenu G+C% de 35.1– 44.9 mol% (ŠVEC & DEVRIESE, 2009).

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont peu exigeantes en facteurs de croissance et peuvent donc se multiplier aisément sur les géloses ordinaires Trypticase-Soja (TS) après 18 à 24 heures d'incubation à 35°C. Les colonies d'entérocoques apparaissent alors translucides (sauf *E. casseliflavus* qui présentent une légère pigmentation jaune) avec un diamètre inférieur à 1 mm (CHRISTOPHE, 2017).

V. Aptitude technologiques des entérocoques

La présence d'entérocoques dans produits laitiers a longtemps été considérée comme une indication de conditions sanitaires insuffisantes lors de la production et la transformation du lait. Cependant, les entérocoques ont une longue histoire d'utilisation sûre dans les aliments. De plus, un nombre considérable de souches appartenant à différentes espèces du genre *Enterococcus* partage des caractéristiques biotechnologiques intéressantes, telles que la production de bactériocines et de probiotiques caractéristiques (FRANZ & al., 1999)

- La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (MAYRA & BIGRET, 2004 ; MONNET & al., 2008). Les entérocoques présentent une faible capacité d'acidification du lait, l'espèce *E. faecalis* est généralement la plus active (SARANTINOPOULOS & al., 2021)
- L'activité protéolytique et peptidolytique est importante pour le développement des bactéries lactiques dans le lait et pour la maturation du fromage. Cette aptitude est variable chez les espèces d'entérocoque, quelques études ont signalé une activité protéolytique pertinente chez les espèces *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans*, alors qu'une faibles activités a été observés pour la plupart des espèces d'entérocoques (WESSELS & al., 1990 ; CENTENO & al., 1999 ; SUZZI & al., 2000) (DOVAT & al., 1970 ; ARIZCUN & al., 1997 ; MACEDO & MALCATA., 1997 ; ANDRIGHETTO & al., 2001).
- Dans ces égards, de nombreux *E. faecalis* et *E. faecium* isolés à partir de produits laitiers se sont révélés être de bons producteurs d'acétaldéhyde, d'éthanol, du diacétyl et d'acétoïne lorsqu'ils sont cultivés dans du lait, contribuant ainsi d'avantage dans le développement de l'arôme et de la saveur des fromages (HAGRASS & al., 1991 ; ANDRIGHETTO & al., 2001 ; SARANTINOPOULOS & al., 2001).
- Il y a peu d'informations disponibles sur le métabolisme du citrate chez les entérocoques. Des souches isolées d'*E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* d'origine alimentaire diffèrent dans leur capacité à utiliser le citrate ou le pyruvate comme

seule source de carbone, la première souche étant plus rapide que les deux autres dans l'utilisation des acides organiques (**SARANTINOPOULOS & al., 2001**).

VI. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ceux-ci résultent de la production de différents composés organiques et non organiques capables d'inhiber ou de limiter la croissance de certains germes pathogènes (**HAMMI, 2016**). En effet, les bactéries lactiques et/ou leurs métabolites antimicrobiens répondent aux exigences des bio-conservateurs alimentaires, pour leur non toxicité à l'homme, les propriétés nutritionnelles qu'elles confèrent aux aliments, leur efficacité à des faibles concentrations, leur activité dans les conditions de stockage à basse température, et leurs effets bénéfiques sur la santé (**STILES, 1996**).

a. Acides organiques

Les métabolites antimicrobiens les plus importants et les mieux caractérisés produit par les bactéries lactiques sont l'acide lactique et l'acide acétique la conversion des sucres en acides organiques et la réduction du pH sont les actions de conservation primaire que les bactéries lactiques fournissent aux aliments fermentés. la quantité et le type des acides produit durant la fermentation influence l'activité microbienne (**SUKSKOVIC & al., 2010**). L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule ou elle s'ionise ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport.

b. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène affecte les lipides membranaires et les protéines cellulaires (**BIENERT et al., 2006**). L'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène est attribué à son effet oxydant sur les cellules bactériennes, notamment à l'oxydation des groupes sulfhydryle des protéines cellulaires et les lipides membranaires (**MORRIS, 1976 ; LINDGREN et DOBROGOSZ, 1990**). Le principal effet antibactérien est de contribuer au blocage de la glycolyse Le peroxyde d'hydrogène a un effet bactériostatique envers les bactéries Gram positives alors qu'il exerce un effet bactéricide contre les bactéries Gram négatives (**BLOM et MORTVEDT, 1991 ; CONDON, 1987 ; LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990**).

c. Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les microorganismes aérobies. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (AMMOR & *al.*, 2006).

d. Les bactériocines

Les bactériocines font l'objet d'une attention accrue due au (O'CONNOR & *al.*, 2020):

- Exigences du consommateur pour minimaliser les aliments transformés par l'ajout des additifs chimiques.
- Leur potentiel en tant qu'alternatives naturelles aux antibiotiques en raison des préoccupations croissantes concernant le problème émergent de la résistance aux antimicrobiens.
- Modulateurs du microbiote humain et par conséquent leur potentiel de traiter des conditions métaboliques complexes telles que le diabète et les maladies inflammatoires de l'intestin.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des petits peptides antimicrobiens, cationiques, amphiphiles (plutôt hydrophobe), produits naturellement par des micro-organismes par synthèse ribosomique, qui varient dans leurs ; spectre et mode d'activité, structure moléculaire et masse moléculaire, la thermo-stabilité, le pH, et leurs déterminants génétiques (BOUSSOUAR, 2017), elles sont généralement incolores, inodores, insipides (PEREZ & *al.*, 2014). De plus, certaines bactériocines présentent une spécificité élevée contre des souches bactériennes sélectionnées et emploient des récepteurs spécifiques sur leur membrane cellulaire (DABA & *al.*, 2017 , 2018), elles ont une activité bactéricide sur les espèces proches de la souche productrice (spectre étroit), ou une gamme variée de (spectre large) de micro-organismes (GALVEZ & *al.*, 2014).

Leur nature protéique permet leur dégradation par les enzymes protéolytiques en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ce qui les rend sans danger pour la consommation humaine (ZACHAROF & LOVITTB, 2012), elles présentent des caractéristiques propres à être utilisés comme agents de conservation des aliments (CLEVELAND & *al.*, 2001).

Selon KLAENHAMMER, (1993) les bactériocines des bactéries lactiques sont classées en 4 classes sur la base des caractéristiques communes, notamment structurelles.

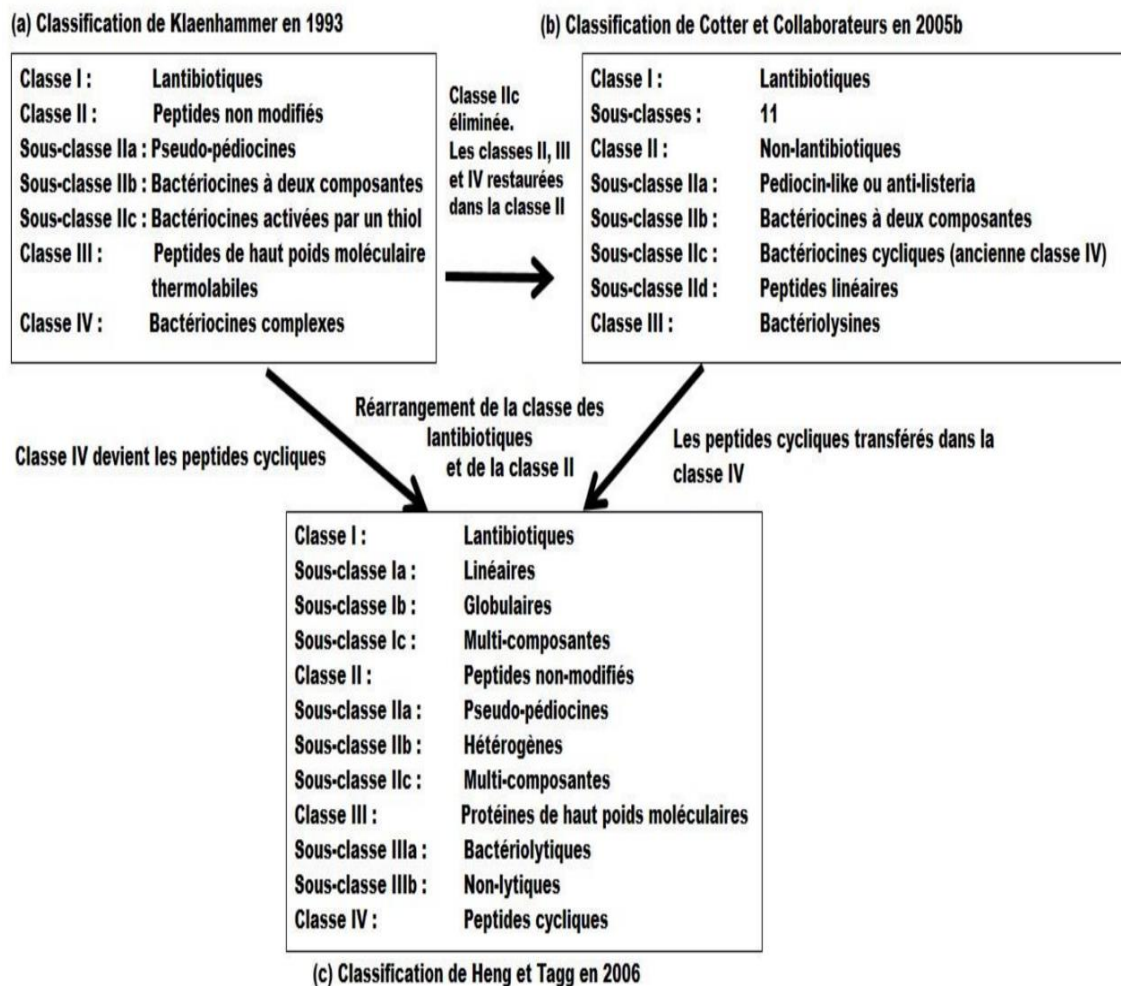


Figure 10. Classification des bactériocines (ESSODOLOM, 2016)

VII. Entérocoques des entérocoques

Les entérocoques du microbiote intestinal de l'homme, animaux et la flore naturel des aliments ont pris de l'importance dans le contrôle de micro-organismes indésirables spécifiquement dans les applications de qualité et de sécurité alimentaire (BEN BRAÏEK & SMAOUI, 2019).

Les bactériocines produites par les entérocoques sont appelées entérocoques, peuvent être appliquées comme conservateurs dans les produits laitiers ou la viande de fermentation (FRANZ & al., 2007). Les entérocoques sont de petits peptides ou protéines antibactériens extracellulaires de synthèse ribosomale, qui présentent un spectre d'inhibition limité à des

bactéries à Gram positif (en particulier des souches étroitement apparentées), des agents pathogènes d'origine alimentaire, et des bactéries d'altération (LEROY & al., 2003).

De nombreuses espèces d'entérocoques, principalement, *E. faecalis* et *E. faecium*, sont connues pour produire une grande variété d'entérocoques, avec une activité contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.*, y compris *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, et *Vibrio cholerae* (FRANZ & al., 1996 ; LAUKOVA & CZIKKOVA, 1999 ; SARANTINOPOULOS & al., 2002).

La plupart des entérocoques appartiennent au bactériocines classe II subdivisée en classe II a, classe II b, classe II c et classe II d (MAKY & al., 2015), elles comprennent les entérocoques A, B, P, L50A/B et la bactériocine 35. Parmi eux, l'entérocoque A produite par la souche *E. faecium* a été la première entérocoque à être complètement caractérisée (REHAIEM & al., 2011), et quelques-unes sont des enzymes lytiques thermolabiles. Préalablement, ces derniers ont été classés comme bactériocines, mais sont maintenant inclus dans une classe distincte des antimicrobiens (COTTER & al., 2005).

a. Mécanisme d'action

Les bactériocines agissent par la formation de pores au niveau des parois des micro-organismes sensibles, dont la première étape consiste en une attraction électrostatique entre la cible cellulaire et la bactériocine conduisant ensuite à d'autres étapes (DEEGAN & al., 2006). Les entérocoques ont la membrane cytoplasmique comme cible principale comme la plupart des bactériocines, ou elles forment des pores, appauvrissant ainsi le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, ce qui entraîne la mort cellulaire (CLEVELAND & al., 2001). Récemment, de nombreuses espèces d'*Enterococcus* ont été rapportées d'avoir des propriétés anti-listériales (BEN BRAÏEK & al., 2019 ; CHAKCHOUK -MTIBAA & al., 2014, 2018) et connu pour inhiber les agents pathogènes d'origine alimentaire (BEN BRAÏEK & al., 2018). Divers mécanismes ont été proposés pour décrire l'action bactéricide des bactériocines. La formation de pores est le mécanisme le mieux décrit. Le spectre d'action relativement faible de certaines bactériocines suggère la présence de récepteurs moléculaires dans la membrane de la cellule cible, même si cela n'a pas été démontrée (VAN BELKUM & STILES, 2000).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

I. Démarche du travail

I.1. Problématique

La conservation des denrées alimentaires est un souci depuis longtemps, elle peut se faire par ajouts des conservateurs chimiques ou naturellement par la présence de la flore microbienne autochtone ou par des substances naturelles, dans notre cas on recherche la présence des entérocoques à activité antimicrobienne dans un produit terroir de la région fabriqué traditionnellement « Jben ».

I.2. Objectifs

Notre étude se base sur l'examen du profil microbiologique d'un fromage frais traditionnel de la région de Naama cas du « Jben » pour isoler de celui-ci les entérocoques et tester leur activité antimicrobienne.

La figure suivante résume la démarche de notre travail.

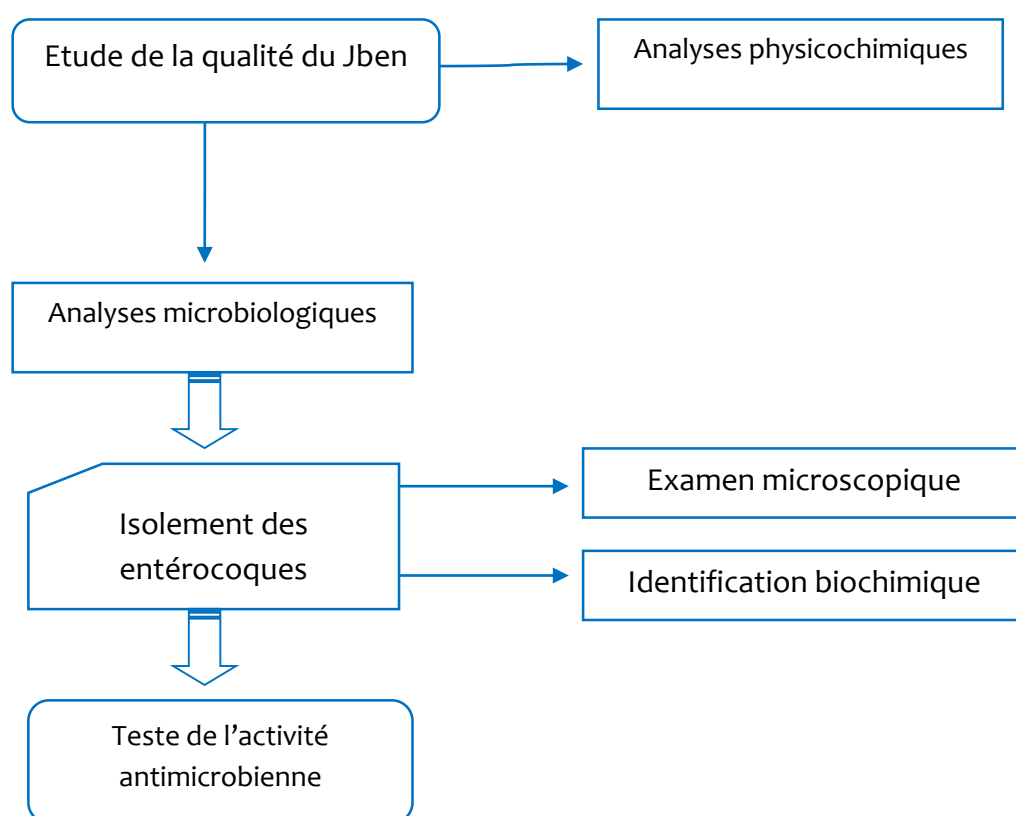


Figure 11. Organisation schématique des objectifs de la recherche.

I.3. Diagramme de fabrication du Jben

Il existe plusieurs recettes familiales de ce fromage traditionnel celle-ci est une d'entre eux résultante du savoir-faire de la région.



Figure 12. Fabrication du Jben à échelle laboratoire

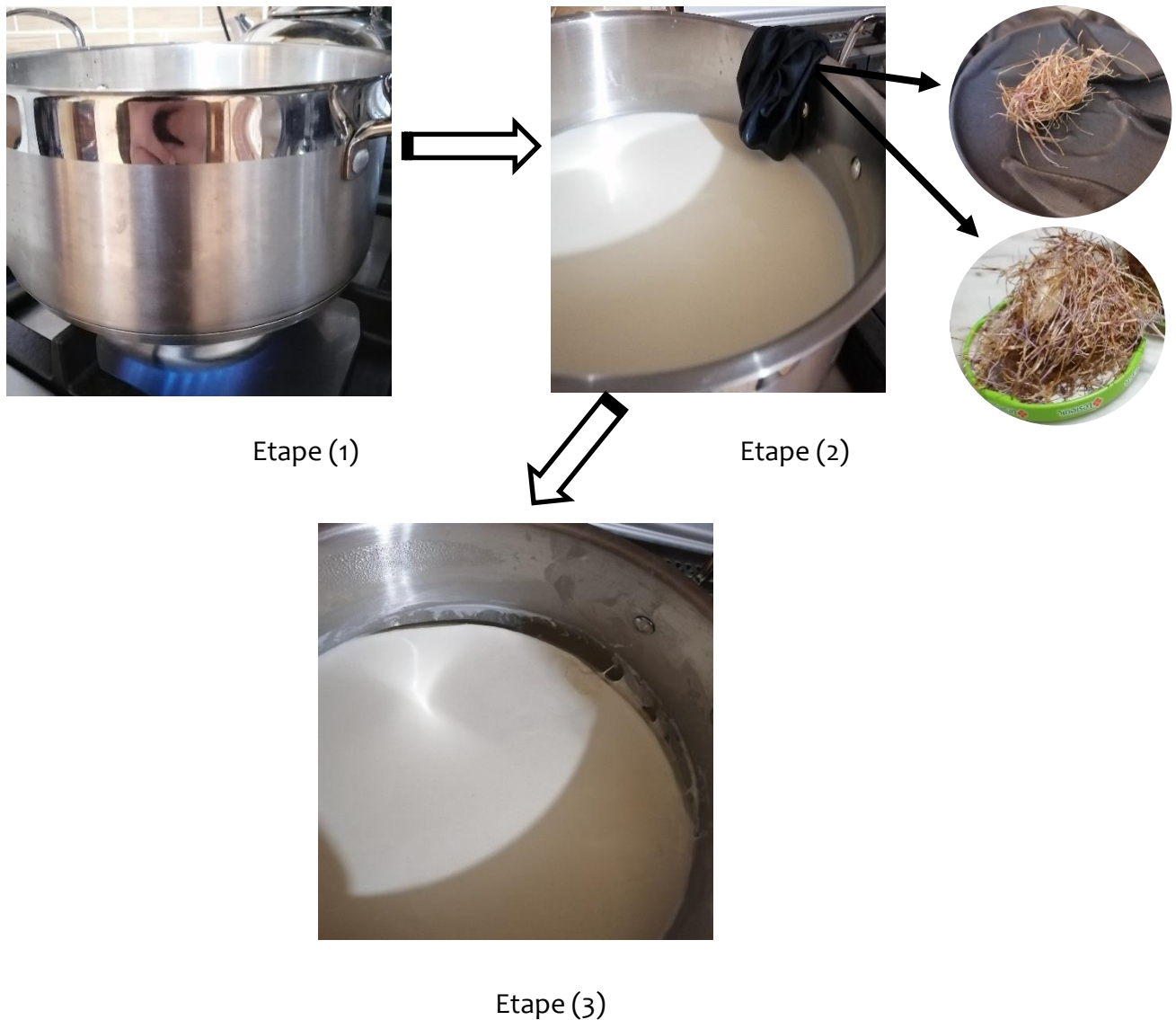


Figure 13. Fabrication traditionnelle du Jben

II. Échantillonnage

Quatre échantillons de fromage artisanal J'ben à base de lait cru de brebis fabriqués selon la méthode traditionnelle (Diagramme de fabrication du Jben **figure 12**) ont été collectés durant le mois d'avril et début mai de l'année 2021. Nous avons prélevé en respectant les règles d'hygiène, aléatoirement, plus de 200g de fromage, dans des sachets stériles étiquetés et puis conservés dans une glacière afin de les transporter au laboratoire (le 4^{ème} échantillon a été fabriqué à échelle laboratoire)

Tableau 7 : Echantillonnage du fromage traditionnel " Jben "

Echantillons	Date de fabrication et de prélèvement	Date d'analyse
E1	04-04-2021	05-04-2021
E2	10-04-2021	12-04-2021
E3	26-04-2021	27-04-2021
E4	04-05-2021	04-05-2021

III. Caractérisation du fromage traditionnel Jben

III.1. Caractérisations physicochimiques

- Toutes les analyses physicochimiques ont été effectuées au niveau du laboratoire de la répression des fraudes (CACQE) dans la Wilaya de Naama.

III.1.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

Mesure de la différence de potentiel entre une électrode de verre et une électrode de référence réunies en un système d'électrode combinée. On a utilisé dans cette étude un pH-mètre de type (HANNA pH210). Dans un mélange de 10 grammes de fromage dilués dans 90ml d'eau distillé, on plonge le pH-mètre et en note la valeur de pH à 0.01 près à la température de mesure (BOUSSOUAR, 2017).

III.1. 2. Mesure de l'acidité titrable

L'acidité du « Jben » a été mesuré par dosage de l'acide lactique à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N. 10g du fromage finement broyé ont été ajouté à 40ml l'eau distillé à une température de 60°C puis laisser refroidir. 50 ml de la solution a été titré par NaOH en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. La phénolphtaléine indique la limite de neutralisation par changement de couleur (rose pâle). L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) (AFNOR, 1986 ; Mathieu, 1998).

$$\frac{v_0 \times 0,01 \times 1000}{v_1} = 10 \frac{v_1}{v_0}$$

Où

V_0 : est le volume, en millilitre, de la prise d'essai.

V_1 : est le volume en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium nécessaire.

III.1.3. Détermination de la matière sèche (JORA N°25 du 04-05-2014)

a. Principe

Séchage d'une prise d'essai pesée et mélangée avec du sable par chauffage dans une étuve réglée à 102°C. Pesée de la prise d'essai séchée afin de déterminer la perte de masse.

b. Mode opératoire

3 g de « Jben » ont été mis dans une capsule préparée (20g de sable et la baguette d'agitation) peser l'ensemble ainsi que le couvercle de la capsule puis placer à l'étuve à 100±4°C pendant 3 heures. Les capsules ont été ensuite introduites dans le dessiccateur afin de revenir à la température ambiante, puis elles sont pesées de nouveau.

Calculer la teneur totale en matière sèche de l'Echantillon pour essai, W_t , exprimée en pourcentage de la masse, à l'aide de l'équation suivante :

$$W_t = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_4)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, de la capsule préparée.

m_1 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai et de la capsule avant dessiccation.

m_2 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai et de la capsule après dessiccation.

m_3 : est la masse, en grammes, de la capsule utilisée pour l'essai à blanc, pour le même temps de dessiccation que m_2 .

m_4 : est la masse, en grammes, de la capsule préparée utilisée pour l'essai à blanc.

III.1. 4. Détermination de teneur en eau (humidité) (AFNOR, 1986)

Représente la quantité d'eau contenue dans le fromage. Elle est exprimé en pourcentage et calculer comme suit :

$$H = 100 - EST$$

Avec :

EST : Extrait sec total.

H : Humidité

III.1.5.Détermination de la matière grasse (JORA N°67 12-11-2014)

a. Principe

Après dissolution des protéines du fromage au moyen d'acide sulfurique, il est procédé à la séparation de la matière grasse par centrifugation dans un butyromètre de Van Gulik, la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso-amylique. Obtention de la teneur en matière grasse par lecture directe sur l'échelle du butyromètre.

b. Mode opératoire

Peser 3 g de l'échantillon et après broyage l'introduire dans un butyromètre de Van de Gulik, l'ajout de l'acide sulfurique est par l'ouverture étroite jusqu'à ce que le niveau de l'acide atteigne une hauteur d'environ les deux tiers de la chambre du butyromètre et que le système de pesage soit complètement recouvert d'acide sulfurique.

Placer le butyromètre, durant 5 min, dans le bain marie, à $(65 \pm 2^\circ)$ C, puis retirer le butyromètre du bain d'eau et l'agiter énergiquement durant 10s, répéter les opérations jusqu'à ce que les protéines soient complètement dissoutes, généralement 1 h.

Retirer le butyromètre du bain d'eau et, après avoir soigneusement agité, ajouter 1 ml d'alcool iso-amylique (3.2) par l'ouverture étroite. Agiter immédiatement durant au moins 3s. Ajouter de l'acide sulfurique par l'ouverture étroite jusqu'à ce que le niveau atteigne le trait repère 35 % de l'échelle puis remettre le butyromètre dans le bain marie pendant 5 min.

Retirer le butyromètre du bain d'eau, ajuster le gros bouchon de façon à amener la colonne de matière grasse dans la partie graduée, et centrifuger le butyromètre à une accélération centrifuge relative de (350 ± 50) g durant 10 min.

La teneur en matière grasse, exprimée en grammes pour 100 g de fromage, est égale à :

$$\text{MG} = \text{B} - \text{A}$$

Dont :

A : est la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse

B : est la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de matière grasse.

III.2. Caractérisations microbiologiques

III.2.1. Préparation de la solution mère et les dilutions (NF V 08 010 de mars 1996)

La réalisation des analyses microbiologiques nécessite d'effectuer une série des dilutions décimales dans le but de réduire la charge microbienne et avoir une répartition uniforme des microorganismes afin de faciliter l'examen microbiologique.

Pour préparer la solution mère on prélève aseptiquement et aléatoirement 10g de fromage artisanal Jben et l'introduire dans un flacon contenant 90ml du diluant Tryptone Sel Eau (TSE) suivi d'une bonne agitation. La préparation de la première dilution décimale 10^{-1} consiste à prélever aseptiquement 1ml de la solution mère et l'introduire dans un tube contenant 9ml du même diluant, ensuite passer à la dilution 10^{-2} on introduit 1ml de la dilution 10^{-1} dans un tube contenant 9ml de TSE, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du nombre de dilutions souhaitées.

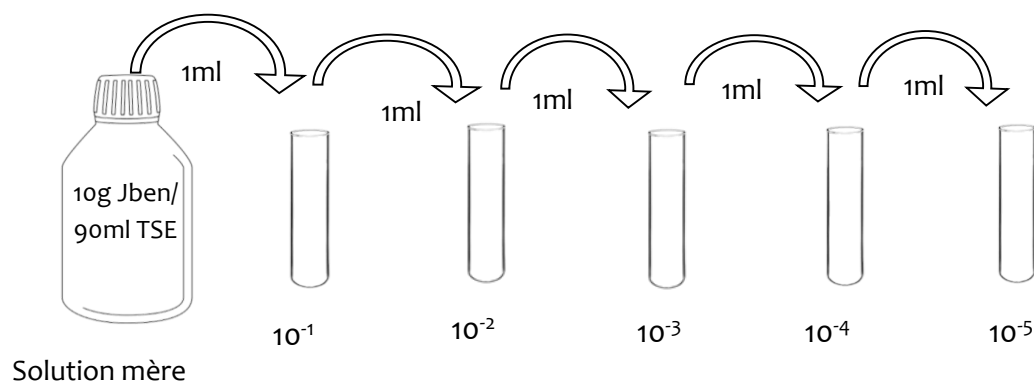


Figure 14. schématisation de la préparation de la solution mère et des dilutions décimales

III.2.2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30°C

Cette flore est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que de la qualité des installations. Le dénombrement a été réalisé sur gélose PCA (Plat Count Agar), par ensemencement en masse d'1 ml de chacune des dilutions décimales de 10^{-2} et 10^{-3} en double suivi d'une incubation à 30 °C pendant 72 h.

On compte les colonies lenticulaires ayant poussé en masse. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un compteur de colonies, en tenant compte uniquement des boîtes contenant entre 30 et 300 colonies (**BOUSSOUAR, 2017**). On calcule le nombre de microorganismes par ml à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Où :

ΣC : La somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues ;

n_1 : Le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : Le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

III.2.3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux (NF V 08-050 et NF V 08-060)

Le dénombrement consiste à ensemercer en profondeur, dans les mêmes conditions, une quantité déterminée (1ml) de la solution mère et des dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} dans un milieu gélosé de Désoxycolate coulé dans une boîte de Pétri. Recouvrir les boîtes avec une couche du même milieu, et les incuber à 30 °C pendant 24 h pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

Le dénombrement repose sur le comptage des colonies caractéristiques qui sont violacées, d'un diamètre de 0,5 mm ou plus, et parfois sont entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile. Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques. Calculer le nombre N de coliformes totaux/fécaux par millilitre, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1d}$$

Où

ΣC : la somme des colonies caractéristiques comptées sur les deux boîtes retenues ;

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution comptée.

III.2.4. Recherche des Salmonelles

Selon le **JORA n° 42 du 15 juin 2005** la recherche des salmonelles dans les produits laitiers implique les étapes suivantes :

- **Pré enrichissement en milieu liquide non sélectif**

25 g du fromage artisanal à analyser sont introduits dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée puis incubées à 37°C pendant 16 à 20 heures.

- **Enrichissement en milieux sélectifs liquides**

A partir des cultures obtenues en pré enrichissement on ensemence un bouillon Rappaport Vassiliadis par un volume de 0,1 ml en double et sont incubés à 42°C, pendant 24 h.

- **Isolement**

À partir des cultures obtenues en enrichissement, on ensemence en stries sur le milieu sélectifs solide Salmonella-Shigella (SS) additionné ensuite les incubées à 37°C pendant 24 h. Les boîtes positives présentent des colonies typiques ayant des aspects caractéristiques des Salmonelles ou des Shigelles. Ces aspects sont les suivants :

- Colonies incolores avec centre noir (production de H₂S), la présence de centre noire élimine la possibilité de *Shigella*.

III.2.5. Recherche des Staphylocoques à coagulase positif (JORA n° 68 du 23 novembre 2014)

Consiste à ensemencer en surface un milieu de culture gélosé sélectif (100 ml de la gélose Baird Parker, 5 ml du surnageant de l'émulsion de jaune d'œuf, 1 ml de Tellurite de potassium) coulé dans une boîte de Pétri, avec 0,1 ml de la solution mère en double. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C.

III.2.6. Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

Après destruction des formes végétatives, par chauffage à 80 °C pendant 10 minutes de 5 ml en double des dilutions 10-1 et 10-2 du fromage artisanal Jben, et refroidissement immédiat par l'eau de robinet pendant 10 minutes. Ces prélèvements sont incorporés dans

des tubes à vis stériles contenant un milieu de base fondu, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer (le milieu viande foie). Après incubation à 37°C, les colonies noires ayant poussé en profondeur sont comptées après 18 h, 48 h et 72 h (GUIRAUD, 2003).

III.2.7. Dénombrement des moisissures et levures

Ensemencement en profondeur d'un milieu de base OGA, en double d'1 ml des dilutions 10⁻⁵ de l'échantillon. Les boîtes sont incubées pendant 5 jours à une température de 22 °C (NF ISO 13 681 V 04-507 Avril 1996).

IV. Isolement et purification des entérocoques

IV.1. Isolement des entérocoques

L'isolement des entérocoques a été réalisé en deux étapes, à partir des résultats du dénombrement des streptocoques du groupe D (fécaux), où on a repiqué les tubes positifs du bouillon Litsky dans du bouillon BHIB, et en parallèle un milieu de culture sélectif solide (Citrates azide) a été ensemencé en profondeur avec 1 ml de la solution mère du Jben, et 1 ml de chaque dilution 10⁻¹ et 10⁻². L'incubation s'est déroulée à 37°C et 42°C pendant 24 à 48h (BOUSSOUAR, 2017).

IV.2. Purification des entérocoques

Des essais préliminaires ont été réalisés portant sur l'utilisation de plusieurs milieux (M17, MRS, Citrate azide Tween Carbonate, Citrate azide, BHIA) de culture afin de maintenir le milieu de culture le plus adéquat pour les entérocoques.

Après une constatation visuelle des aspects culturels sur les différents milieux de culture solide, on a sélectionné les colonies distinctes. Ensuite nous les avons purifiées sur les mêmes milieux dont elles ont été issues, et dans les mêmes conditions. Après croissance des colonies en boîte, on prend de chaque boîte une colonie isolée sur laquelle seront effectuées une coloration de Gram, et la recherche de la catalase. Les bactéries à Gram positif, et catalase négative sont retenues et repiquées sur bouillon MRS ou BHIB, puis incubées à 42°C pendant 18 h. Une dernière purification a été réalisée sur le milieu CATC, où les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies, rose-rouge ou marron, lisses, légèrement bombées dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (BALOWS & al., 1992 ; DOMIG, 2003 ; HELENI & al., 2006).

IV.3. Conservation des isolats

a. La conservation à court terme

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur bouillon BHI. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fera tous les trois semaines (BADIS & al., 2004)

b. La conservation à long terme

À partir des cultures jeunes (18h) sur milieu liquide, on ajoute la culture jeune dans le milieu de culture de conservation. Le milieu de conservation contient du bouillon MRS ou BHI additionné de 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en cryotubes à -20°C. Indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le bouillon BHI, avant utilisation (BADIS & al., 2004 ; SAIDI & al., 2002).

IV.4. Identification biochimique des isolats

IV.4.1. Recherche de la catalase

Les bactéries lactiques sont aérobies anaérobies facultatives et ne possèdent pas l'enzyme catalase pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. Pour ce test une goutte de H₂O₂ à 10% est déposée sur une lame en verre propre et une quantité de colonie prélevée à l'aide d'une anse stérile y est ajoutée, le résultat est positif lorsqu'il y a apparition de bulles représentant le dégagement d'O₂. Seules les colonies négatives au test de catalase ont été retenues pour la suite des analyses (LARPENT & al., 1990).

Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



IV.4.2.Mannitol mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (MARCHAL & al., 1991).

IV.4.3.Utilisation du Citrate

Le milieu Citrate de Simmons coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Les germes sont ensemencés en stries sur les tubes qui contiennent le milieu de citrate de Simmons incliné, puis incubé à 37°C / 24h. Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

IV.4.4.Tolérance au tellurite

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, la gélose à 0.04% de tellurite de potassium par les isolats à tester. Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires (BOUSSOUAR, 2017).

IV.4.5.Test d'hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang et gélose Columbia additionné de 5% du sang défibriné humain. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné. Les entérocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies) ; β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié) (BOUSSOUAR, 2017).

IV.4.6.Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de cet hétéroside est mise en évidence sur le milieu gélosé à l'esculine (DEVOYODE & POUILLAIN, 1988 ; LARPENT & al., 1997), l'hydrolyse de l'esculine est un des critères usuels de l'identification au sein de nombreux groupes bactériens. L'esculine est un hétéroside. Son hydrolyse, catalysée par une β -glucosidase et l'esculinase, libère du

glucose et l'aglycone : l'esculétine. Produite réagit avec les ions de fer III pour former un précipité noir dans le milieu. Le milieu utilisé est le bouillon à l'esculine. Après 24h-48h à 37°C d'incubation, le résultat se traduit par un noircissement du tube.

IV.4.7. Test TSI (Triple sugar Iron)

Pour mettre en évidence la fermentation des trois sucres (lactose, glucose et saccharose), nous avons procédé à l'ensemencement du culot par piqûre profonde et incubé à 30°C pendant 24h. Ce test permet également la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz (bulles dans la gélose) pente par une strie médiane (TABAK & BENSOLTANE, 2012).

IV.4.8. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)

L'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.

a. Principe

La galerie API 20 STREP comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BOUSSOUAR, 2017).

V. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène

V.1. Méthode de disque

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu Mueller Hinton (DO660 varie entre 0.08 et 0.1 correspondent à 0.5 McFarland), ensuite des disques stériles de papier Whatman imbibés avec 10 µl de la culture jeune à

tester sont déposés sur ce tapis. Une fois les boîtes sont séchées à une température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (BERECKA & *al.*, 2009).

V.2. Méthode de diffusion par puits (BAREFOOT & KLAENHAMMER, 1983)

Cette méthode a été modifiée par plusieurs auteurs comme PUIZANI & *al.*, 1992. Cette méthode consiste à : On aensemencé des souches productrices de substances inhibitrices dans du milieu MRS liquide et incubées à 37°C pendant 16 à 24h en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide d'un filtre Millipore de 0.45 µm et neutralisé avec du NaOH (N1) afin d'avoir un pH de 6,8-7 et il est conservé à 4°C. Ensuite une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide estensemencée par la souche test initialement préparée (DO = 0,08 - 0,1 à 660nm) parécouvillonnage. On laisse les boîtes sécher à température ambiante pendant 30 minutes, des puits sont ensuite réalisés avec un emporte-pièce ou une cloche de Durham stérile. Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture à tester et les boîtes seront mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37°C en anaérobiose, afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la formation du peroxyde d'hydrogène.

V.3. Recherche de substances inhibitrices de nature protéique

Les bactériocines étant connues pour être des protéines résistantes à des températures élevées, la thermostabilité des substances inhibitrices a été testée par chauffage à 100°C pendant 0,15, 20 et 30 min du surnageant des souches testées. Comme précédemment, on utilise la méthode de diffusion en puits, le surnageant a été neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH 0,1N pour éliminer l'effet des acides organiques. Afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène accumulé dans le milieu de culture, le surnageant a aussi été traité deux heures par une catalase à 30°C avant de procéder au test d'inhibition (LABIOUI & *al.*, 2005).

Chapitre IV

Résultats et discussion

Le Jben est considéré comme fromage frais par plusieurs études (**BENKERROUM & TAMIME, 2004 ; EI MARNISSI & al., 2013 ; BENYAGOURB & al., 2016 ; TADJINE & al., 2020**), selon **CHAMBRA & IRLINGER en 2004** le fromage frais est un fromage peu égoutté qui n'a pas été affiné, il y'a juste coagulation des protéines du lait sous l'effet des ferments lactiques (acidification).

Le Jben ne présente pas de caractéristiques définie à causes des méthodes artisanales utilisées pour sa préparation reposant, essentiellement, sur les connaissances acquises à partir d'une longue expérience (**SALMERON & al., 2002**). Ce dernier peut être préparé à base de plusieurs types de lait (lait de vache, chèvre ou de brebis). Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (**POZNANSKI & al., 2004**). La fabrication (statut hygiénique) et la commercialisation (statut marketing) du Jben n'est pas sujette à la réglementation officielle en vigueur et de fait le produit suit des circuits de commercialisation informels (**GUETOUACHE & al., 2015**).

On s'est intéressé dans notre étude expérimentale sur le Jben produit à partir du lait de brebis pour :

- Valoriser le lait de brebis en tenant compte de la nature de la région agropastorale steppique et sa richesse en cheptel.
- Etude de la qualité hygiénique du produit finis (Jben) en s'appuyant des analyses physicochimiques et microbiologiques.
- Evaluation des capacités antibactériennes et bactériocinogène isolés à partir de la matrice susceptible.

Il n'y a pas beaucoup d'études ayant porté sur l'étude du Jben de brebie, il est donc difficile de comparer nos résultats à d'autres.

I. Caractérisation du fromage traditionnel Jben

I.1. Caractérisations physicochimiques

Les analyses physicochimiques contribuent au jugement sur la qualité finale d'une denrée alimentaire.

Dans le cas d'une matrice dérivée du lait, la détermination du pH, l'acidité titrable, la matière sèche, la teneur en eau, et la matière grasse sont des paramètres déterminants pour attester de sa qualité.

Les résultats des analyses physicochimiques sont résumés sur le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultats des analyses physico-chimiques.

Paramètres physico-chimiques	pH	Acidité titrable	Matière sèche (%)	Teneur en eau (%)	Matière grasse (%)
Moyennes	4.9	63°D	31.27	68.73	15

L'exploitation physicochimique des différents résultats des paramètres physico-chimiques prélevés du Jben analysé laissent voir des valeurs de pH se situant entre 4,80–4,98. Ces valeurs confirment que globalement le pH du Jben est légèrement acide avec une valeur moyenne de 4,9. Ces résultats sont en adéquation à ceux des travaux de **BENHEDDI & HELLAL (2019)** qui ont mentionné des valeurs de 4,42 à 4,90. Cette acidité peut être allouée à l'activité acidifiante des bactéries lactiques présentes dans le Jben ou à sa matière première.

La lecture des résultats de la teneur en eau laisse voir des teneurs très importantes (66,41 à 71,05%) et des teneurs en matière sèche variables de 28,95 à 33,59%. Ces résultats confirment les teneurs élevées de la matière première en eau 82,9% (**PARK & al., 2007 ; EL GALIOU & al., 2015**). De même les teneurs en matières sèche ainsi obtenus peuvent être expliqués par la courte durée d'égouttage au moment de la fabrication du Jben.

L'acidité titrable renseigne sur la quantité de l'acide lactique dans l'échantillon. La moyenne de l'acidité titrable affichée sur le tableau notant que la marge de variation de cette acidité c'est étalé entre de 63°D – 65°D c'est l'équivalent à 6.3 et 6.5 g/L de teneur en

acide lactique produit. Il est à signaler que l'acide lactique produit est la résultante de la fermentation du lactose par la flore autochtone du lait (bactéries lactiques). Ces valeurs indicent de la fermentation lactique très active contribuent à la variation du pH du produit, et concordent les valeurs trouvées du pH. Ces résultats sont inférieurs à ceux signalés par **RHIAT & al. (2013)**, et de **GUETOUACHE & al. (2015)**.

La teneur en matière grasse est un des principaux paramètres de la matière solide du fromage qui varie (**OUADGHIRI & al., 2005**). L'expression de la moyenne des résultats de la matière grasse affiche une teneur de 15 g/100g pour les essais effectués, c'est un indicateur que le Jben est un fromage à pâte molle.

Les variations trouvées dans les paramètres physicochimiques de cette recherche reflètent que le Jben reste un fromage frais traditionnel aux caractéristiques indéfinies et inconstantes.

1.2. Caractérisations microbiologiques

De même que les aliments nourrissent les gens qui les consomment, ils peuvent aussi être le siège du développement des micro-organismes. Les développements microbiens sont contrôlés par des facteurs liés à l'aliment lui-même (facteurs intrinsèques), par des facteurs extrinsèques, qui concernent le milieu dans lequel l'aliment est conservé ; et par tout agent conservateur qui a pu avoir ajouté (**WILLIEY & al., 2017**).

L'étude du statut microbiologique consiste à vérifier la conformité du produit et s'assurer qu'il est propre à la consommation.

Le dénombrement la FAMT reste la meilleure méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de la qualité des aliments dans le contrôle industriel (**BONNEFOY & al., 2002**). Les valeurs du dénombrement de la flore aérobie mésophile totale des 4 échantillons analysés mentionnées sur **la figure 15** montre une forte charge sur tous les échantillons avec des valeurs peu variables. La moyenne de FAMT est de 5×10^5 UFC/g. Notant que l'échantillon numéro 1 a présenté la teneur la plus élevée. Les résultats du dénombrement de la FAMT ont été presque similaires à celle signalé par **RHIAT & al. (2011)** ayant réalisé une investigation microbiologique du Jben et Klila fabriqués au laboratoire. Il est à signaler que le taux élevé de la charge microbienne au niveau de notre matrice peut être expliqué par le manque de respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication

que nous avons constaté au cours de tous le processus de fabrication du Jben (de la traite du lait jusqu'à la production), ce taux important de FAMT est un indice révélateur sur la probabilité d'avoir une présence de germe pathogène, en effet nous avons constaté que pour les 3 derniers échantillons une forte contamination par les coliformes totaux et fécaux.

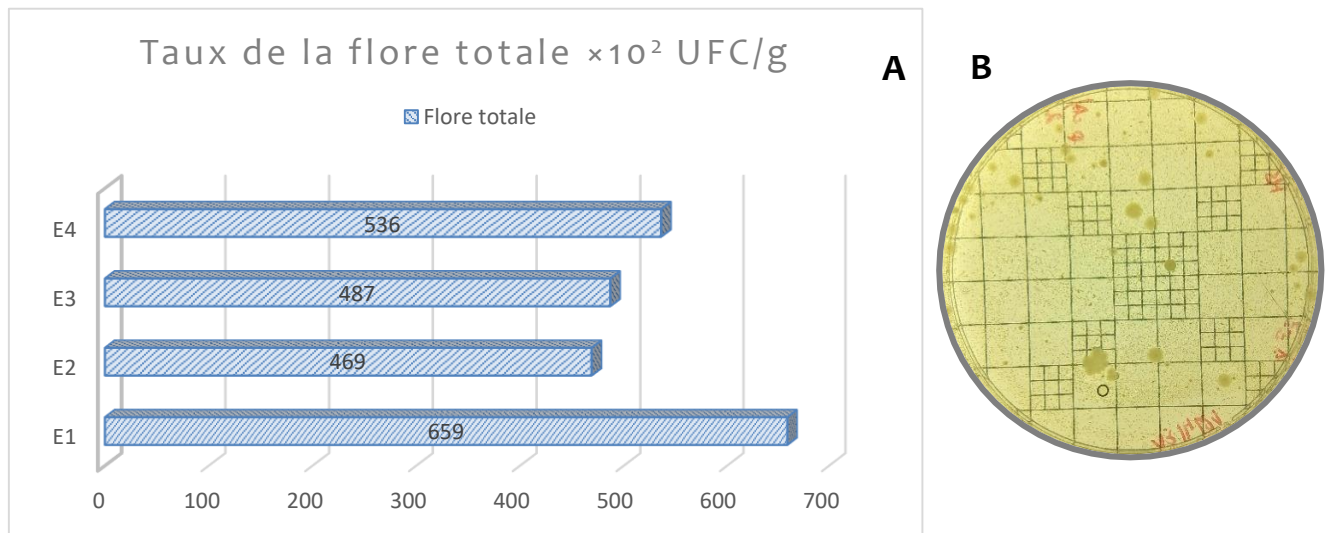


Figure 15 : Résultats des analyses de la flore aérobies mésophile totale des différents échantillons (A : Taux de la flore mésophile totale, B : Flore mésophile sur milieu PCA).

L'intérêt de la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et contamination fécaux est de déterminer la présence de contamination fécale dans le produit testé (JOFFIN & JOFFIN, 1999). La contamination fécale est importante dans les 3 derniers échantillons avec $0,47 \times 10^4$ pour les coliformes totaux et $4,3 \times 10^4$ UFC/g pour les coliformes fécaux. Une absence de ces 2 paramètres a été observée sur le 1^{er} échantillon. Le taux inférieur des coliformes totaux par rapport aux coliformes fécaux peut être dû au chauffage modéré du lait lors de la préparation du Jben. Le taux des coliformes totaux est inférieur à ceux de GUETOUACHE & al. (2015) et les valeurs des coliformes fécaux sont proches de ceux d'EL MARNISSI & al. (2013) d'une moyenne de $5,6 \times 10^4$ tandis que LAHRECH & al. (2018) ont signalé l'absence totale des coliformes. L'ensemble des valeurs sont affichées sur la figure suivante.

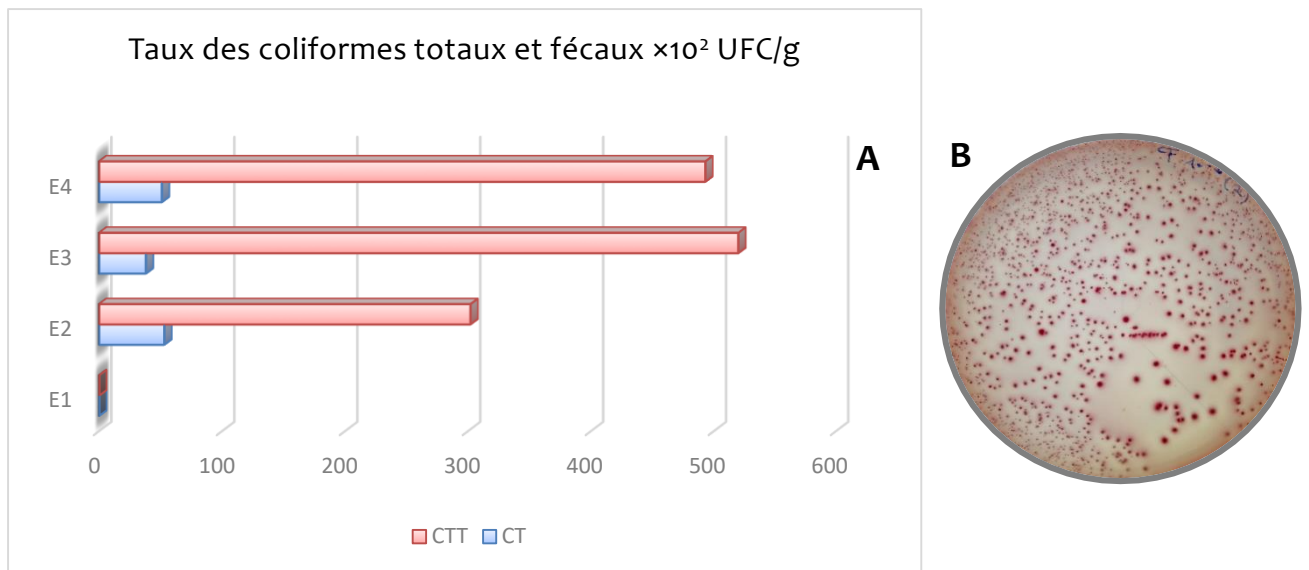


Figure 16 : Résultats des analyses des Coliformes totaux (CT) et des coliformes fécaux (CTT) des différents échantillons (A : Taux des coliformes totaux et fécaux, B : croissance des coliformes fécaux sur milieu DCL).

Les clostridiiums sont capables de survivre dans l'environnement et de contaminer n'importe quel type d'aliment ou de matériel si les conditions d'hygiène et de stérilisation ne sont pas respectées (LEBRES, 2002). L'investigation microbiologique de nos échantillons a révélé l'absence totale des anaérobies sulfite-réducteurs a été noté pour tous les échantillons analysés. Pour ce qui est des *Staphylococcus* à coagulase positive sont considérés comme étant un indicateur de la présence des bactéries pathogènes majeures, véritable causes des infections mammaires (DODD & BOOTH, 2000), une nette absence de ces propagules a été observé sur tous nos échantillons est un indicateur que le lait utilisé a présenté une bonne qualité sanitaire. Ces résultats sont en parfaite corrélation à ceux de LAHRECH & al. (2018) ayant travaillé sur des fromages à base de lait de chèvre, vache et de brebis dans la steppe Algérienne.

Par contre une présence des *Staphylococcus* à coagulase négatif a été observé sur l'ensemble des échantillons analysés, selon la bibliographie ces germes sont des acteurs appartenant à la flore originelle de l'animal ou de l'homme lors de la traite pouvant se retrouvés au niveau du produit finis (WILLEY & al., 2017).

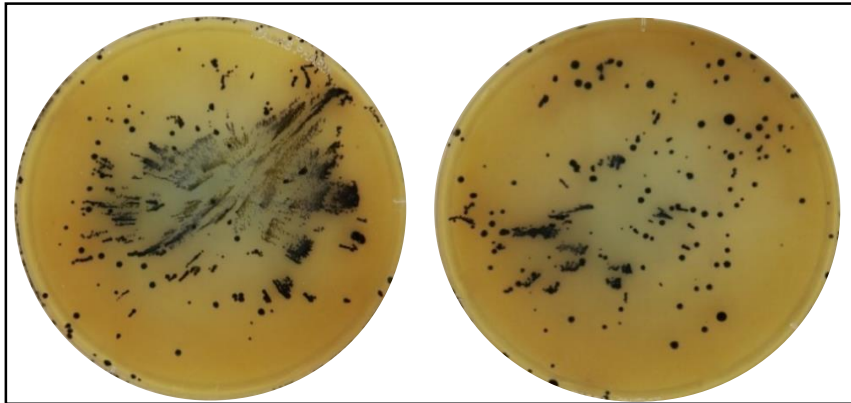


Figure 17 : *Staphylococcus* à coagulase négative sur milieu Baird Parker

Contrairement à plusieurs études (BENYAGOUB & *al.*, 2016 ; RHIAT & *al.*, 2011) ayant signalé une absence des salmonelles dans l'ensemble de leur échantillons, une présence des Salmonelles a été très remarquable sur les échantillons 3 et 4. L'exploitation du résultat sur-cité laisse prévoir une probable maladie de l'animal d'où la transmission de ce genre de bactérie lors de la traite où bien une mauvaise hygiène du manipulateur lors de la traite.

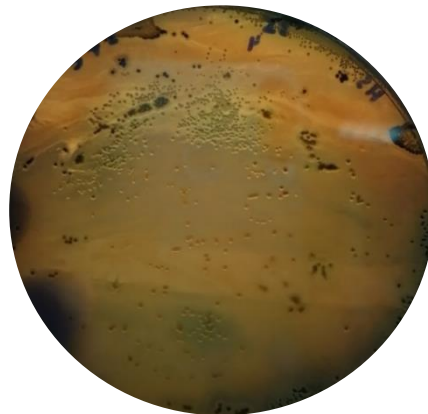


Figure 18 : Croissance des Salmonelles sur milieu SS

On s'est basé sur les données de JORA (1998) au lieu de 2017 (car ce dernier réglemente seulement le fromage frais à partir du lait pasteurisé) pour juger la conformité de notre produit.

Tableau 9 : Critères microbiologiques du fromage frais (JORA, 1998).

Fromage frais	m
Coliformes	10
Coliforme fécaux	1
<i>S.aureus</i>	10
<i>Salmonelle</i>	abs

A la lumière des résultats obtenus et tenons compte des seuils microbiologiques l'ensemble des échantillons peuvent être déclarés non satisfaisants considéré du fait de la présence des coliformes totaux et fécaux et de la suspicion de présence des salmonelles sur E3 et E4.

La matrice analysé est très sensible aux altérations et peut être vecteur des souches opportunistes due à sa fabrication à base d'un produit sensible et facilement périssable (lait cru).

II. Isolement et identification des isolats

Sur le volet de la recherche de nouvelles molécules à potentialités biologiques pouvant être produite à partir des bactéries lactiques (entérocoques) autochtones de notre produit terroir, il a été question de prospecter 12 isolats.

Après la recherche des *Streptocoques* du groupe D (fécaux), il a été question de repiquer les tubes positifs du bouillon Litsky dans du bouillon BHIB et de purifier les souches sur les milieux de culture suivants (BHIA, Citrate Azide).

II.1. Identification morphologiques des isolats

L'étude morphologique des souches isolées nous a permis de sélectionner 12 isolats appartenant au genre *Enterococcus*.

II.1.1 Caractérisations macroscopiques

L'observation macroscopique des souches isolées sur milieu citrate azide montre l'apparition de petites colonies grises ou incolores avec un halo noir. Sur milieu BHIA les différentes propagules microbiens ont affichés des colonies grandes arrondies avec un

diamètre d'environ 2 à 5mm, lisse de couleur blanche, et avec un contour régulier. Ces résultats sont similaires avec ceux de **Boussouar (2017)** et **Konard & al. (2013)**.

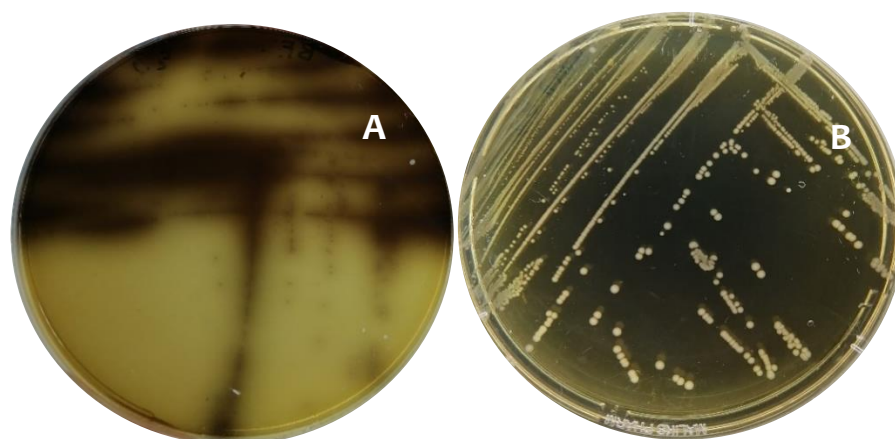


Figure 19 : Aspects des isolats sur les milieux (A : Citrate Azide, B : BHIA)

II.1.2. Caractérisations microscopiques

L'examen de l'état frais et la coloration de Gram ont révélés que tous les isolats sont des cocci à Gram positif, isolées, en diplocoque, en courtes chainettes ou en amas et sont immobiles, preuves tangibles confirment leur appartenance à la grande famille *Enterococcaceae*.

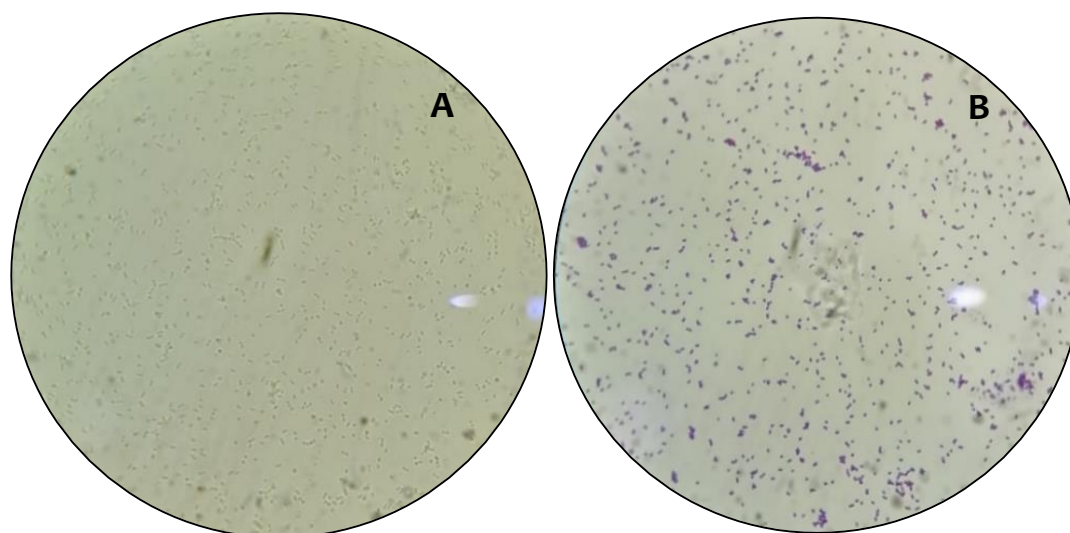


Figure 20: Caractérisations microscopiques des isolats. A : Observation microscopiques d'état frais $\times 100$; B : Observation microscopique de la coloration de Gram $\times 100$.

II.2. Identification biochimique des isolats

L'activité enzymatique sert souvent à différencier des bactéries. Il est généralement possible de distinguer des bactéries étroitement apparentées et de les regrouper en des espèces distinctes au moyen d'épreuves biochimique (GERARD & al., 2016).

II.2.1. Recherche de la catalase

Une absence de dégagement gazeux après dépôt des colonies sur la lame additionnée d'eau oxygéné a été observée pour toutes les souches isolées. Ceci confirme que ces souches sont dépourvus de catalase ce qui les rend sensibles aux effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène.

II.2.2. Mannitol mobilité

Les résultats de ce test indique un virage de couleur du milieu du rouge au jaune qui indique à son tour la fermentation du mannitol, avec une seule croissance seulement au niveau de la pique d'ensemencement ce qui prouve l'immobilité de nos isolats.



Figure 21 : Test de Mannitol Mobilité.

II.2.3. Utilisation du Citrate

Le métabolisme du citrate est visualisé par le virage de l'indicateur coloré en bleu. Les résultats de ce test ont été négatifs pour toutes les souches isolées. Ce qui indique l'absence du citrate perméase chez l'ensemble souches, et donc leur incapacité d'utiliser du citrate comme seule source de carbone.

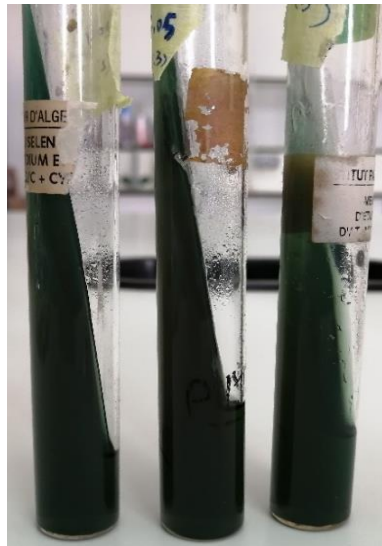


Figure 22 : Test de Citrate de Simmons.

II.2.4. Hydrolyse de l'esculine

Toutes les souches isolées ont présenté un précipité noir sur le milieu BEA (Bille Esculine Agar) ce qui indique leur capacité à hydrolyser l'esculine par la présence de l'enzyme esculinase.

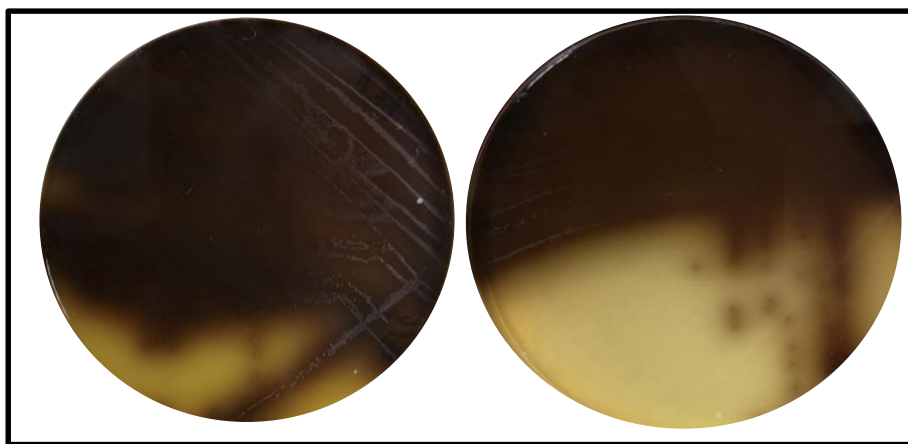


Figure 23 : Résultats de l'hydrolyse d'esculine.

II.2.5. TSI (Triple Sugar Iron)

Ce milieu permet de déterminer la capacité des micro-organismes à fermenter le lactose, le glucose et le saccharose qui se traduit par un virage de couleur du milieu au jaune et la réduction des sulfates en sulfures, qui en présence de fer, donne un précipité noir. Les isolats investigués ont été positifs pour la fermentation des trois sucres.



Figure 24 : Résultats du test TSI

Tableau 10 : Résultats des tests biochimiques classiques

Isolats	Gram	Catalase	Tests biochimiques				
			MAN	MOB	TSI	ESC	C-S
I1	+	-	+	-	+	+	-
I2	+	-	+	-	+	+	-
I3	+	-	+	-	+	+	-
I4	+	-	+	-	+	+	-
I5	+	-	+	-	+	+	-
I6	+	-	+	-	+	+	-
I7	+	-	+	-	+	+	-
I8	+	-	+	-	+	+	-
I9	+	-	+	-	+	+	-
I10	+	-	+	-	+	+	-
I11	+	-	+	-	+	+	-
I12	+	-	+	-	+	+	-

II.2.6. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)

Dans le souci de renforcer l'identification des isolats et combler le manque des 2 tests (Tolérance au tellurite et test d'hémolyse), nous nous sommes orientés vers l'investigation de d'autres critères biochimiques en utilisant la galerie API 20 STREP.

D'après cette identification et l'exploitation des données du logiciel APIWEB toutes les souches isolées (12 isolats) font partie de la même espèce *Enterococcus faecium*, avec des pourcentages variables entre 99,4% et 98,1%.

La dominance des espèces d'*Enterococcus faecium* est similaire de ceux chez **P.RIVAS & al. (2012)** dans une étude sur le potentiel antibactérien des *E. faecium* isolés à partir du lait de brebis et un fromage dérivé de ce dernier, résultat qui allouent à la faible diversité trouvée dans le niveau de l'espèce à la niche écologique à partir de laquelle ils étaient isolés, les résultats sont aussi similaires à celle **LAZREG (2017)** et **BOUSSOUAR (2017)**, alors que selon **NIETO-ARRIBAS & al. (2010)** *E. faecalis* était l'espèce dominante suivie par *E. faecium* dans une étude sur un fromage espagnol, **PSONI & al. (2006)** ont signalé qu'*E. durans* a le taux le plus élevé suivi par *E. faecium* isolés depuis le fromage Batzos.

Toutes les souches isolées détiennent un arsenal enzymatique diversifiés riche en : Pyrrolidonyl Arylamidase, β -Galactosidase, Leucine aminopeptidase et Arginine dihydrolase. En plus de ces enzymes les isolats 6, 7 et 8 sont capables de synthétiser l'enzyme α -Galactosidase. Tous les entérocoques isolés ont démontré le pouvoir de produire l'acétoïne.

L'identification par galerie API a indiqué la capacité des différents *Enterococcus faecium* de fermenter plusieurs sucres dont : le ribose, arabinose, mannitol, lactose, tréhalose, seulement les isolats 6, 7 et 8 ont montré la capacité de fermenté le sucre raffinose. Ces résultats ont été exprimés par virage de couleurs des microtubes du rouge au jaune, c'est une indication d'acidification.

Ainsi on peut déduire que les isolats 6,7 et 8 peuvent être des sous espèces d'*E. faecium* différentes par quelques métabolismes biochimiques des 9 autres isolats.



Figure 25 : Résultats de l'identification biochimique par galerie API 20 STREP

Tableau 11 : Résultats de l'identification par galerie API 20 strep

Isolat	VP	HIP	ESC	PYRA	αgal	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC
l1	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l2	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l3	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l6	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
l7	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
l8	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
l9	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l10	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l11	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
l12	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

III. Détection des bactéries potentiellement bactériocinogène

Les potentialités biologiques de nos souches ont été aussi mises à l'épreuve par un essai d'antagonisme (effet antagoniste) de nos isolats sur les 4 souches de références choisies *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Bacillus subtilis* (ATCC 21332), *Bacillus cereus* (ATCC 10876).

La méthodologie engagée pour cette investigation a été réalisée par 3 méthodes : celle des disques consistant à tester l'activité antibactérienne des souches isolées tel qu'elles sont, la méthode des puits ou on teste l'activité antibactérienne du surnageant filtré, la dernière se spécifie à la recherche des bactériocines, après chauffage du surnageant et l'inhibition d'autres facteurs antibactériens.

Toutes les souches isolées ont montré une absence du pouvoir antibactérien vis-à-vis les souches pathogènes dans les trois méthodes utilisées.

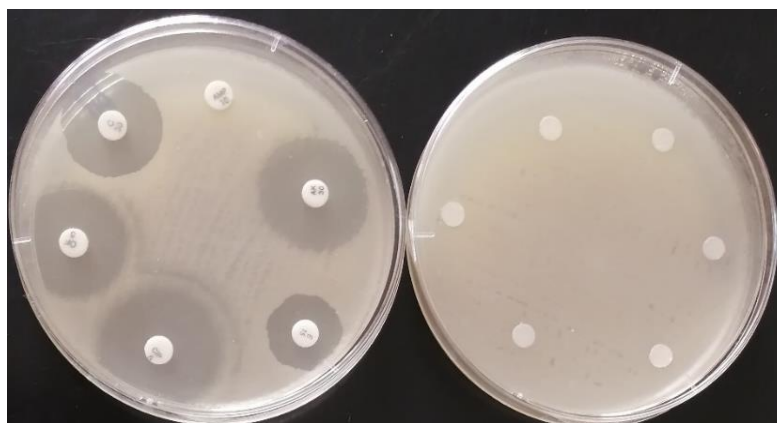


Figure 26 : Test de l'activité antibactérienne d'*E. faecium* sur *Listeria monocytogenes* par méthode des disques.

GHRAIRI & al. (2008), AHMADOVA & al. (2012) et VERA PINGITORE & al. (2011) ont signalé la présence de l'activité antibactérienne chez l'espèce *E. faecium* isolée à partir de différents fromages artisanaux contre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus. sp* et son absence vis-à-vis les bactéries à Gram négatif dont *E. coli*.

Dans notre point de vue l'absence de l'activité antibactérienne des entérocoques isolés peut expliquer la présence abondante des staphylocoques à coagulase négative trouvée lors des analyses microbiologiques du fait que nos isolats n'ont pas d'effet bactéricide sur 3 espèces à Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) et que généralement les *Enterococcus faecium* présentent une activité contre les *Staphylococcus. sp* et *S. aureus* (**FAVARO & al., 2013 ; ASPRI & al., 2017**).

Le nombre de souches isolés a minimalisé la probabilité de détecter l'activité antibactérienne, vu l'absence de diversité des espèces d'entérocoques (12 isolats de la même espèce et donc la similarité de métabolisme).

Conclusion générale

Le lait et les produits laitiers constituent une grande valeur nutritive en raison de leur richesse en protéines, calcium et vitamines. Les produits laitiers sont un résultat de la nécessité de conserver le lait et d'améliorer ses qualités organoleptiques, et donc à travers le monde existe plusieurs recettes typiques à leurs régions en se basant sur sa flore, sa faune et son climat.

L'Algérie est un pays vaste avec une diversité géographique et culturelle, à cet effet il existe une gamme importante de produits artisanaux ou leur dénominations et processus de fabrication différent d'une région à une autre, on cite à titre d'exemple : le Rayeb, le Lben, Le Smen, le Bouhazza, la Klila et le Jben.

La wilaya de Naama est une région agropastorale riche en produits terroirs de différents natures qui sont typique à sa nature et son climat afin de valoriser un de ces produit le Jben (fromage frais traditionnelle) on a poursuit cette étude dans le but d'avoir sa labélisation et commercialisation réglementaire dans le future proche en s'appuyant sur deux plan :

- Essayer de dresser une fiche signalétique dans le but de la valorisation de ce produit terroir (sur le plan physicochimique et microbiologique).

À travers les résultats des analyses physicochimiques obtenus il en ressort que le Jben est un fromage acide (4,80 à 4,98), un taux en acide lactique entre 6.3 et 6.5 g/L et une teneur en eau élevée 66,41 à 71,05% ce qui prouve qu'il fait partie des fromages frais.

L'investigation microbiologique a révélé un niveau de contamination un peu élevé, constitué principalement de la flore mésophile totale ($4,69 \times 10^4$ à $6,59 \times 10^4$ UFC/g) suivie par les coliformes fécaux d'une moyenne de $4,3 \times 10^4$ UFC/g, des coliformes totaux (moyenne de $0,47 \times 10^4$), avec l'absence totale des *Staphylococcus* à coagulase positif, les anaérobies sulfito-réducteurs, les levures et moisissures et la présence des salmonelles sur la moitié des échantillons analysés.

- Tenant compte de la typicité du produit, nous avons essayé de voir les potentialités biologiques des entérocoques isolés à partir de cette matrice pour évaluer leurs probables actions antibactériennes.

12 souches à Gram positif et catalase négatif ont été isolés, d'après l'identification biochimique ces souches appartiennent à l'espace *E. faecium* avec des pourcentages variables entre 99,4% et 98,1%. Tous les isolats ont révélés une activité antibactérienne négative vis-à-vis des bactéries à Gram positif et *E.coli* à Gram négatif. Le screening de l'activité antibactérienne mérite une investigation plus poussée nécessitant la présence des moyennes nécessaires à un bon déroulement de l'évaluation.

A propos des perspectives futures pour la continuation et le développement de ce travail :

- ✚ Etude approfondie du profil microbiologique du Jben, et la recherche d'autres germes pathogènes trouvés dans les produits laitiers.
- ✚ Intégration des produits artisanaux dans la réglementation algérienne.
- ✚ Valorisation et investissement des produits terroirs par isolement des starters typiques de la région et les commercialisés.
- ✚ Elargir le nombre des échantillons et des isolats pour permettre d'établir toutes les corrélations possibles.
- ✚ Utiliser d'autres techniques pour tester l'activité antibactériennes des isolats.
- ✚ Tester l'activité antifongique des entérocoques isolés.
- ✚ Identification moléculaire et plus approfondies d'*E.faecium* isolés pour confirmer leurs identités.

Références bibliographiques

a

1. **AGREGAN, RUBEN & ALONSO, ELISA & TORRADO AGRASAR, ANA & PEREZ GUERRA, NELSON.** (2014). A Review on Some Important Factors Affecting Bacteriocin Production by Lactococci, Lactobacilli and Pediococci. *Current Biochemical Engineering*. 666. 1-2.
2. **AHMADOVA, AYNUR & TODOROV, SVETOSLAV & SFAXI, I & CHOISSET, Y & RABESONA, H & MESSAOUIDI, S & KULIYEV, A & FRANCO, B & CHOBERT, J-M & HAERTLE, T.** (2013). Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*. 20pp
3. **AISSAOUI Z.O** fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel Algérienne « Bouhezza ». Thèse doctorat en science alimentaire. Université de Constantine 1. (2014) :196 pp+annexes
4. **AMIMOUR M.** Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (J'ben).Thèse doctorat en science agronomie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.2019 :174pp+annexes.
5. **AMMOR S., TAVERON G., DUFOUR E., et CHEVALLIER.,** (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, 17 : pp 454-468.
6. **ARIZCUN, C & BARCINA, Y & TORRE, PALOMA.** (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. *International journal of food microbiology*. 38. 17-24.
7. **ASPRIS, MARIA & O'CONNOR, PAULA & FIELD, DES & COTTER, PAUL & ROSS, PAUL & HILL, COLIN & PAPADEMAS, PHOTIS.** (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*. 73. 10.1016
8. **Association française de normalisation, AFNOR,** 1986. Contrôle de la qualité des produits laitiers, recueil des normes françaises, paris, France 3ème édition pp663.
9. **AYAD, EMAN & NASHAT, S & EI-SADEK, N & METWLY, H & EI SODA, MORSI.** (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological Criteria. *Food Microbiology*. 21. 715-725.

10. **AXELSSON, L.** (2004) Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology. In : Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67.

B

11. **BADIS, A., GUETARNI, D., BOUDJEMA .M, B., HENNI, D., KIHAL, M.,** (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21, 579–588.
12. **BALOWS A., TRUPER H.G., DWORKIN M., HARDER W. & SCHLEIFER K.H.** (1992). The prokaryotes second Ed – vol 11. Springer Verlage, New York.pp.3917-3933
13. **BARBOSA, JOANA & FERREIRA, VANIA & TEIXEIRA, PAULA.** (2009). Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. Food microbiology. 26. 527-32.
14. **BELABBES M.** Qualité Nutritionnelle et Aptitude de Transformation Technologique du Lait de Brebis selon le Système d'élevage. Thèse doctorat en Production et Biotechnologie Animales. Universite Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 2019 : 189pp+annexes.
15. **BELDJILALI A.** Contribution à l'étude microbiologique et sanitaire du lait cru de brebis de la région ouest de l'Algérie. Thèse doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran 1.2015 : 146 pp+annexes.
16. **BELKUM, MACRO & STILES, MICHEAL.** (2000). Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Natural product reports. 17. 323-35.
17. **BEN BRAIEK, OLFA & SLIM, SMAOUI.** (2019). Enterococci : Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. BioMed Research International. 2019. 1-13.
18. **BENCHARIF, A.,** (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : états des lieux etproblématiques. Options Méditerranéennes Série B. Etudes et Recherches 32: 25-45.
19. **BENDIMERAD N.** Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactique de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type « jben ».thèse doctorat en microbiologie alimentaire. Universite Aboubekr Belkaid Tlemcen, 2013 :255pp+annexes.

20. **BENHEDDI, W & HELLAL, A.** (2019). Technological characterization and sensory evaluation of a traditional Algerian fresh cheese clotted with *Cynara cardunculus* L. flowers and lactic acid bacteria. *Journal of Food Science and Technology*. 56. 1-8.
21. **BENKERROUM N., TANTAOUI ELARKI A. & ELMARAKCHI A.,** 1984. Hygienic quality of marrocaïn Iben. *Microbiol. Alim. Nut.*, 2, 199-206.
22. **BENSAID A.** Sig et télédétection pour l'étude de l'ensablement dans une zone aride : Le cas de la wilaya de Naâma (Algérie). *Géographie*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006.
23. **BENYAGOUB E & BOULANOVAR A & AHMED, M & NABBOU N.** (2016). Essai d'évaluation de l'activité antibactérienne de la gomme arabique d'*Acacia tortilis* (Forssk) contre quelques souches bactériennes pathogènes. *Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege*. 85. 237-252.
24. **BERECKA M. P., WASKO A., & KOSTON D.,** (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales*. Vol. LXIV1.
25. **BIENERT, GERD & SCHJOERRING, JAN & JAHN, THOMAS.** (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta*. 1758. 994-1003.
26. **BILKOVA, ANDREA & KINOVA SEPOVA, HANA & BILKA, FRANTISEK & BALAZOVA, ANDREA.** (2011). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Ceská a Slovenská*
27. **BLOM, H. & C. MORTVED,** 1991. Antimicrobial substances produced by food associated microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 19:694-698.
28. **BOUCHRIT H & al.** Phytoécologie de *Hammada scoparia* dans la région de Naâma (Algérie occidentale). *Botanica Complutensis*.42, 2018: 93-99.
29. **BOUDALLIA S, BENATI D, BOUKHROUBA R, CHEMAKH B, CHEMAM M.** Physico-chemical properties and hygienic quality of raw and reconstituted milk in the region of Guelma-Algeria. *International journal of agricultural research* 2016:11(2) :77-83.
30. **BONNEFOY, C., GUILLET, F., LEYRAL, G. & VERNE-BOURDAIS, É.** (2002) Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Aquitaine : Doin, Paris.
31. **BOUSBIA A, BOUDALIA S, CHELIA S, OUDAIFIA K, AMARI H, BENIDIR M, & al** .Analysio of factors affecting consumer behavior of dairy products in Algeria ; a case study

from the region of Guelma. International Journal of Agricultural recherche .2017; 12(2) :93-101.

32. **BOUSSOUAR N.**, (2017). Caracterisation technologique et sanitaire des enterocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest Algerien. Thèse Doctorat en Microbiologie, universite Aboubekr belkaid, Tlemcen : pp152+annexes.



33. **CARLOS, ANA RITA & SEMEDO-LEMSADDEK, TERESA & BARRETO-CRESPO, M.T. & TENREIRO, ROGERIO.** (2009). Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. Journal of applied microbiology. 108. 1563-75.
34. **CASE C, FUNKE B, TORTORA G.** microbiology .12th édition, pearson education, Canada, (2016) :pp1118, 257-258
35. **CENTENO, JUAN & MENENDEZ, SANTIAGO & HERMIDA, MA & RODRIGUEZ-OTERO, J.L..** (1999). Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro Cheese manufacture. International journal of food microbiology. 48. 97-111.
36. **CHAKCHOUK-MTIBAA, AHLEM & ELLEUCH, LOBNA & SLIM, SMAOUI & NAJAH, SOUMAYA & SELLEM, IMEN & ABDELKAFI, SLIM & MELLOULI, LOTFI.** (2014). An antilisterial bacteriocin BacFL31 produced by *Enterococcus faecium* FL31 with a novel structure containing hydroxyproline residues. Anaerobe. 27pp
37. **CHAKCHOUK-MTIBAA, AHLEM & SELLEM, IMEN & KAMOUN, YOSRA & SLIM, SMAOUI & KARRAY-REBAI, INES & MELLOULI, LOTFI.** (2018). Safety Aspect of *Enterococcus faecium* FL31 Strain and Antibacterial Mechanism of Its Hydroxylated Bacteriocin BacFL31 against *Listeria monocytogenes*.
38. **CHOUBIALA, LEKSIR & BOUDALIA, SOFIANE & MOUJAHED, NIZAR & MABROUK, CHEMMAM.** (2019). Traditional dairy products in Algeria : case of Klila cheese. Journal of Ethnic Foods. 6pp
39. **CHRISTOPHE I.** (2017). *Enterococcus* spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques. thèse doctorat. université de Caen Normandie, 299pp

40. **CLEVAELAND, JENNIFER & MONTVILLE, THOMAS & CHIKINDAS, MICHEAL.** (2002). Bacteriocins : Safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 71. 1-20. 10.
41. **CONDON, SEAMUS.** (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Letters. 46. 269-280.
42. **COTTER, PAUL & HILL, COLIN & ROSSE, R.** (2005). Bacteriocins : Developing Innate Immunity for food. Nature reviews. Microbiology. 3. 777-88.

D

43. **DEROUICHE M.** Lait et produits laitiers : diversification, fréquences et modes de consommation dans la tradition algérienne .Thèse DOCTORAT Sciences Alimentaires. UNIVERSITE CONSTANTINE 1.2017 :222pp + annexes
44. **Direction des services agricoles de la wilaya de Naama,** 2016
45. **DODD F.H., BOOTH J.** 2000. Mastitis and milk production. Dans the healthy of dairy cattle. Edition Andrews A.H, London, pp. 213-255
46. **DOVAT, A.M. & REINBOLD, G.W. & HAMMOND, E.G. & VEDAMUTHU, E.R..** (1970). Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic group streptococci isolated from young Cheddar cheese. J. Milk Food Technol.. 33. 365-372.

E

47. **El MARNISSI, B., BENNANI, L., COHEN, N., et al.** (2013) Presence of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk and Traditional Dairy Products Marketed in the North-Central Region of Morocco. African Journal of Food Science, 7, 87-91.

F

48. **farmacie** : casopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti. 60. 65-72.
49. **FOULQUIE MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., & DE VUYST, L.** (2006).The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology, 106, 1e24.

50. **FRANZ, CHARLES & HUCH, MELANIE & MATHARA, JULIUS & ABRIOUEL, HIKMATE & EL BAKALI, NABIL & REID, GREGOR & GALVEZ, ANTONIO.** (2014). African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 190. 84–96.
51. **FRANZ, C.M., HOLZAPFEL, W. & STILES, M.E.**(1999) Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiologie* 47, 1-24
52. **FRANZ, CHARLES & SCHILLINGER, U & HOLZAPFEL, WILHELMI.** (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International journal of food microbiology*. 29. 255-70.



53. **GAGLIO, RAIMONDO & COUTO, NATACHA & MARQUES, CATIA & LOPES, MARIA & MOSCHETTI, GIANCARLO & POMBA, CONSTANCA & SETTANNI, LUCA.** (2016). Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 236pp
54. **GALIOU, OUIAM & SAID, ZANTAR & BAKKALI, MOHAMMED & LAGLAOUI, Amin & CENTENO, JUAN & CARBALLO, JAVIER.** (2015). Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco. *Small Ruminant Research*. 129
55. **GARRIDO, ANTONIO.** (2014). Antimicrobial Resistance in Enterococci. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*. 02. 10.
56. **GHRAIRI, T & JACQUES & BERJEAUD, JEAN-MARC & MANAI, M.** (2008). Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*. 19. 162-169.
57. **GUETOUCHE, M & GUESSAS B.** (2015). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cow's milk. *African journal of microbiology research*. 9. 71-77.
58. **GUIRAUD, J.** (2003). *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques*. Ed, Dunod, Paris, 2003, 651 p.

H

59. **HAGRASS, A. & FAYED, EMAN & AIY, ALY & EI-SAMRAGY, YEHIA.** (1991). Growth characteristics of enterococci isolated from Laban Rayeb. *Die Nahrung*. 35. 209-13.
60. **HAMDI M, HACHI M, LAHRECH A et CHOUKRI A** 2018 : Production fromagère par un extrait de kaolin du gésier de poulet avec du lait de vache, de brebis ou de chèvre dans la steppe Algérienne. *Livestock Research for Rural Development*. 30.
61. **HAMMI, IKRAM.** (2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français.
62. **HENNI N.** utilisation des bactéries lactiques pour la fabrication d'un yaourt probiotiques à partir d'un lait de brebis. Magister en microbiologie alimentaire et industriel. Université d'Oran, 2011 :171 pp+annexes.

I

63. **INAYAT, S ., M.A. ARAIN, M.KHASKHELI & A.H.MALIK,** 2003.Study of the effect of processing on the chemical quality of soft unipened cheese made from camel milk. *Park. J.Nutr.*, P : 102-105.
64. **ISO 13681 V 04-507** Avril (1996). Viande et produits à base de viande
Dénombrement des levures et moisissures- technique par comptage des colonies.
Analyse microbiologique tome 2. Méthodes sectorielles. AFNOR 6eme ED. 325-334.

J

65. **JOFIN, C. & JOFFIN, J.-N.** (1999) 'Microbiologie alimentaire', Biofutur, 1999(189), p. 45. Doi : 10.1016/S0294-3506(99)80417-7.
66. **Journal officiel de la république Algérienne** n°35 1998.
67. **Journal Officiel** : JO n°42-2005.Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.
68. **Journal Officiel** : JO n° 25-2014.Arrêté du 8 décembre 2013 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière sèche des fromages et des fromages fondus.

69. **Journal Officiel** : JO n° 67-2014. Arrêté du 17 décembre 2013 rendant obligatoire une méthode de détermination de teneur en matière grasse dans le fromage.

70. **Journal officiel** : JO n° 68 -2014. Arrêté du 23 novembre 2014 rendant obligatoire une méthode de recherche des *Staphylocoques* à coagulase positif.

K

71. **KABIR A.** Contraintes de la production laitier en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectif). Thèse doctorat en microbiologie alimentaire. Université d'Oran 1,2015 :195pp+annexes.

72. **KHOUALDI G.** Caractérisation du fromage traditionnel algérien « Medeghissa ». MAGISTER En sciences alimentaires. Université des Frères Mentouri Constantine 1,2017 :142pp+annexes.

73. **KLAENHAMMER, T.R..** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev.. 12. 39-86.

74. **KREZIAK, D & LENGLET, FRANCOIS & LACROIX, ANNE.** (2010). La valorisation des produits de terroir par les aménités environnementales : Une approche expérimentale. IREGÉ : 26pp.

L

75. **LABIOUI H, ELMOUALDI L, EL YACHIOUI M, OUHSSINE M.** SÉLECTION DE SOUCHES DE BACTÉRIES LACTIQUES ANTIBACTÉRIENNES. Bull. Soc. Pharm, 14,2005, 237-250.

76. **LAHSAOUI S.,** (2009). Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire d'Ingénieur en Agronomie, université El hadj lakhdar, Batna.

77. **LARBIER M, LECLERCQ B.** 1992. Nutrition et alimentation des volailles INRA, Paris. 347 p.

78. **LARPENT-GOURGAUD M., MICHAUX O., LARPENT J.P., DESMASURES N., DESMAZEAUD M., MANGIN I., MASSON F., MONTEL M.C., et TAILLIEZ P.,** (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent JP. Tec & Doc, Lavoisier : pp199-255.

79. **LAUKOVA, ANDREA & CZIKKOVA, S & LACZKOVA, S & TUREK, PETRE.** (1999). Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally

contaminated dry fermented Hornád salami. International journal of food microbiology. 52. 115-9.

80. **LAZREG, L.** (2016). Bactériocines d'entérocoques isolés de lait cru et de beurre de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1.
81. **LEBRES.**2002. Manuel des travaux pratiques, cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments, unité microbiologie des laits et des produits, laitiers, institut pasteur d'Algérie, pp. 21-27
82. **LEROY, FREDERIC & FOULQUIE-MORENO, MARIA & DE VUYST, LUC.** (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. International journal of food microbiology. 88. 235-40.
83. **LINDGREN, SVEN & DOBROGOSZ, WALTER.** (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. FEMS microbiology reviews. 7. 149-63.
84. **LUQUET F.M.1986** .Lait et produits laitiers vache, brebis, chèvre. 2ème édition .les produits laitiers transformation et technologie .Tec et Doc. LAVOISIER.

M

85. **MAHAMED I.A.** Etudes de qualité hygiénique, physicochimique et microbiologique des ferments et des beurres traditionnels destinés à la consommation dans différentes régions Algérie. mémoire de magister .Université d'Oran1,2015:137pp+annexes .
86. **MAKY, M.A., ISHIBASHI, N., ZENDO, T., PEREZ, R.H., DOUD, J.R., KARMI, M. & al.** (2015). Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. Appl Environ Microbiol. 81:4819-4826
87. **MARCEL, M.** (2007). Larousse agricole Edition Larousse. Paris. France. 115-405.
88. **MARCHAL N., BOURDON J.L., et RICHARD C.L.,** (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed., Doin éditeurs, Paris.
89. **MAYRA-MAKINEN, A. & BIGRET, M..** (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria.

90. **MEDJOUDJ, H & AOUAR, L & ZIDOUNE, M & HAYALGLU, A.** (2018). Proteolysis, microbiology, volatiles and sensory evaluation of Algerian traditional cheese Bouhezza made using goat's raw milk. *International Journal of Food Properties*. 20. 1-20.
91. **MORRIS, J. (1976).** Fifth Stenhouse-Williams Memorial Lecture Oxygen and the Obligate Anaerobe. *Journal of Applied Microbiology - J APPL MICROBIOL*. 40. 229-244.
92. **MOUNIER, JEROME & MONNET, CHRISOPHE & VALLAETS, TATIANA & ARDITI, ROGER & SARTHOU, ANNE-SOPHI & HELIAS, ARNAUD & IRLINGER, FRANCOISE.** (2008). Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*. 74. 172-81.
93. **MOZZI, FERNARDA & VANINGELGEM, FREDERIK & HEBERT, ELVIRALA M & MEULEN, R & FOULGUIE-MORENO, MARIA & FONT de VALDEZ, GRACIELA & DE VUYST, LUC.** (2006). Diversity of Heteropolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Applied and environmental microbiology*. 72. 4431-5.

N

94. **NACER, SABRI & HAGEN, KAREN & VANCANNEYT, MARC & CLEENWERCK, ILS & SWINGS, JEAN & TOMPKINS, THOMAS.** (2006). *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 (Approved Lists 1980). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 56. 355-60.
95. **NF : V 08-010 Mars (1996).** *Microbiologie des aliments-Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique ; Analyse microbiologique tome 1 ; Méthodes horizontales*. AFNOR 6eme ED. 67-75.NF V 08-050
96. **NIETO-ARRIBAS, P & SESENA, S & POVEDA, J & CHICON, R & CABEZAS, L & PALOP, L.** (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese : Biodiversity, technological and safety aspects. *Food microbiology*. 28. 891-9.



97. **O'CONNOR, PAULA & KUNIYOSHI, TAIS & OLIVEREIRA, RICARDO & HILL, COLIN & ROSS, REYNOLDS & COTTER, PAUL.** (2020). Antimicrobials for food and feed ; a bacteriocin perspective. *Current opinion in biotechnology.* 61. 160-167.
98. **OKURO, P & THOMAZINI, MARCELO & BALIEIRO, JULIO & LIBRERAL, ROBERTA & FAVARO-TRINDADE, CARMEN.** (2013). Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International.* 53. 96–103.
99. **ORHAN ORUC, ORHAN CETIN, DARILMAZ D' NURYUSEKDAG Z .**Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *LWT.*184pp
100. **OUADGHIRI, M & AMAR, M & VANCANNEYT, M & SWINGS, J. (2005).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters.* 251. 267-71.



101. **PAVLOVIC M., HUBER I., KONRAD R. & BUSCH U.,** Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open Microbiol. J.,* 7 : 135-41, 2013.
102. **POZNANSKI, ELISA & CAVAZZA, AGOSTINO & CAPP, FABRIZIO & CIOCCONCELLI, PIER SANDRO.** (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from alpine natural park. *International journal of food microbiology.* 92. 141-51.
103. **PRESCOTTE LM., HARELY JP., DONALD A. 2017.**Microbiologie, DE Boeck université, 5^{ème} édition 979 pp : 146-147. 928
104. **PSOMAS, AKIS & ANDRIGHETTO, CHRISTIAN & LITOPOULOU-TZANETAKI, EVANTHIA & LOMBARDI, ANGIOLEKKA & TZANETAKIS, N.** (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International journal of food microbiology.* 69. 125-33.
105. **PUIZANI R.S., RAO R.D., SIUNKI R.,** (1992). Antimicrobial activity of lactic culture : partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus Thermophilus*. *J.Food Science,* 44 : pp575-578.

R

106. **REHAJEM, A., Z. B. BELGACEM, M. R. EDALATIAN, B. MARTINEZ, A. RODRIGUEZ, M. MANAI, N. P. GUERRA.** 2014. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. Food Contr. 37:343–350.
107. **RHIAT, M., LABIOUI, H., DRIOUICH, A., MENNANE, Z., & OUHSSINE, M.** (2013). Preparation of the starter Trial production of cheese (Jben) and Klila at laboratory scale. Food Science and Quality Management, 13, 1-8
108. **RIVAS, F & CASTRO, M & VALLEJO, M & M, EMILIO & CAMPOS, C.** (2012). Antibacterial potential of *Enterococcus Faecium* strains isolated from ewe's milk and cheese. LWT - Food Science and Technology. 46. 428–436.

S

109. **SARANTINOPOULOS P., LEROY F., LEONTOPOULOU E., GEORGALAKI M., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU E., DE VUYST L.,** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. Int. J. Food Microbiol., 72.,125-136.
110. **SARANTINOPOULOS, PANAGIOTIS & KALANTZOPOULOS, GEORGE & TSAKALIDOU, EFFIE.** (2002). Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. Applied and environmental microbiology. 67. 5482-7.
111. **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 cheese making. Food microbiology, 19(2-3), 167-174
112. **SCHLEIFER, KARL & KILPPER-BALZ, RENATE.** (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 Bacteriology. 34. 10.
113. **SHORI, A, B.** (2017). Microencapsulation Improves Probiotics Survival During Gastric Transit. HAYATI Journal of Biosciences. 24. 10.
114. **SOUSA-GALLAGHER, MARIA JOSE & MALCATA, FRANCISCO.** (1997). Comparison of Plant and Animal Rennets in Terms of Microbiological, Chemical, and Proteolysis

Characteristics of Ovine Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM. 45.

115. **STILES, MICHAEL.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70. 331-45.
116. **SUZZI, GOVANNAL & CARUSO, MARISA & GARDINI, FAUSTO & LOMBARDI, ANGIOLELLA & VANNINI, LUCIA & GUERZONI, ELISABETTAL & ANDRIGHETTO, CHRISTIAN & LANORTE, M.T..** (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto Caprino). *Journal of applied microbiology*. 89. 267-74.

T

117. **TAALE, ESSODOLOM.** (2016). Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : Caractérisation biochimique et moléculaire des souches productrices de bactériocines isolées à partir d'aliments.
118. **TADJINE, D & BOUDALIA, S & BOUSBIA, A & GUEROUI, Y & SYMEON, G & BOUDECHICHE, L & A, TADJINE & M, CHEMMAM.** (2020). Milk heat treatment affects microbial characteristics of cows' and goats' "Jben" traditional fresh cheeses. *Food Science and Technology (Campinas)*. 41.

V

119. **VAN TYNE, DARIA & GILMORE, MICHAEL.** (2014). Friend Turned Foe : Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. *Annual review of microbiology*. 68.
120. **VERA PINGITORE, ESTEBAN & TODOROV, SVETOSLAV & SESMA, FERNANDO & FRANCO, BERNADETTE.** (2012). Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food microbiology*. 32. 38-47.
121. **VIMONT, ALLISON & FERNANDEZ, BENOIT & HAMMAMI, RIADH & ABABSA, AHLEM & DABA, HOCINE & FLISS, ISMAIL.** (2017). Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk. *Frontiers in Microbiology*. 8. 865.

W

122. **WESSELS, DELILLE & JOOSTE, PIET & MOSTERT, J.F.** (1990). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *International journal of food microbiology*. 10. 349-52.
123. **WIEDEMANN, IMKE & BÖTTIGER, TIM & BONELLI, RAQUEL & WIESE, ANDRE & HAGGE, SVEN & GUTSMANN, THOMAS & SEYDEL, ULRICH & DEEGAN, LUCY & HILL, COLIN & ROSS, PAUL & SAHL, HANS.** (2006). The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 - A complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Molecular microbiology*. 61. 285-96.

Y

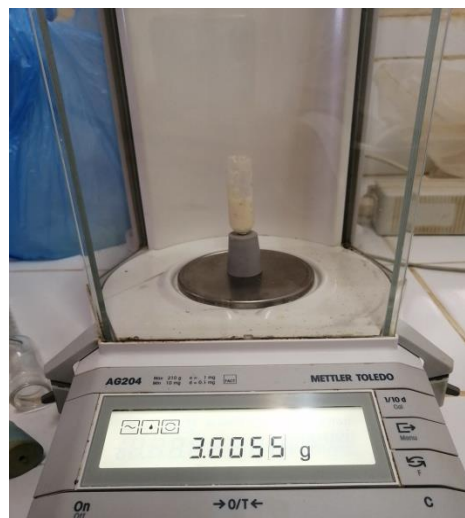
124. **YOON K.Y., BYEON J.H., PARK J.H., ET HWANG J.,** (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 373 : pp572–575.

Annexes

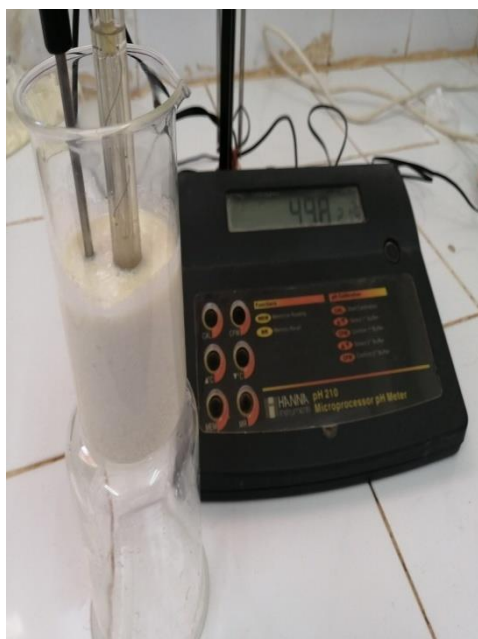
Annexes A (Quelques matériels utilisés)



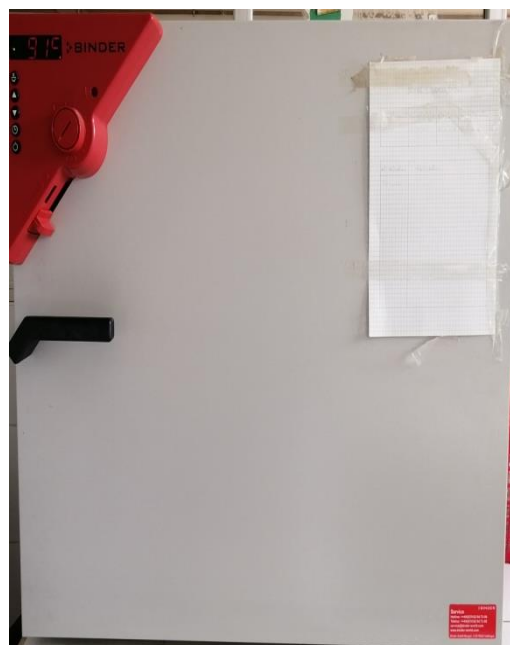
Centrifugeuse Gerber



Balance



pH-mètre



Etuve

Annexe B « milieux de culture »

Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth)

Protéose-peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5g
Infusion de coeur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2g
Glucose	2g
Eau distillée	1000ml

PH 7,4. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Polypeptone	10 g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillée	1000ml

pH 5,7 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	20g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	9g
Phosphate monopotassique	1,5g
Eau distillée	1000ml

pH 7,2. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillée	1000ml

pH 6,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose M17

Peptone de caséine	2,50g
Peptone de viande	2,50g
Peptone de soja	5g
Extrait de levure	2,50g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,50g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose CATC (Citrates Azides Tween Carbonate)

Peptone de caséine	15g
Extrait de levure	05g
Potassium KH ₂ PO ₄	06g
Citrate de Sodium	05g
Tween 80	1ml
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7 +/- 0,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Solutions ajoutées

Carbonate de Sodium	2g
TTC	0,1g

Azide de Sodium	0,4g
-----------------	------

Stérilisation des solutions par filtration.

Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose de Columbia au sang

Peptones	23g
Amidon	1g
Chlorure de sodium	5g
Agar	10g
Sang	50ml

pH 7,3 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min le milieu de base.

Après refroidissement du milieu de base ajouter le sang défibriné stérile dans une zone stérile.

Gélose à l'esculine

Peptones	10g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7,5 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min

Coloration de Gram

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **PRESCOTT & al., 2003**.

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
3. Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
5. Couvrir de Lugol pendant 30 secondes
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
7. Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool en inclinant la lame et par goutte à goutte
Jusqu'à disparition complète de la coloration violette
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
9. Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.