



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse et contrôle de qualité des denrées alimentaires.

Thème

Isolement, Purification et Identification des probiotiques (Lactocoques) dans la propolis

Présenté par : DAACHI Nassira
KASMI Narimane

Devant le jury :

Président :	ALILI Dahmane	M A B (Univ Mouhamed El Bachir El IBRAHIMI)
Encadreur :	BELHADJ Med T	M A A (UnivMouhamed El Bachir El IBRAHIMI)
Examineur :	SOUAGUI Yasmina	M A A (UnivMouhamed El Bachir El IBRAHIMI)

Année universitaire : 2016/2017

Table de matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01

Partie bibliographique

Chapitre I : généralités sur les abeilles

1. Étude de l'abeille	04
2. Taxonomie.....	04
3. Les races des abeilles	06
4. L'organisation sociale des abeilles.....	07
4.1. La reine.....	07
4.2. Les faux-bourdons.....	08
4.3. Les ouvrières.....	08
5. La morphologie générale des abeilles	09
6. Répartition géographiques des abeilles mellifères.....	12
7. Le rôle des abeilles.....	12
7.1. Rôle biologique.....	12
7.2. Rôle économique.....	12
7.3. Rôle de bio-indicateur.....	13
8. Les produits de la ruche.....	13
8.1. La gelée royale.....	13
8.2. Le pollen.....	13
8.3. La cire.....	13
8.4. Le venin.....	14
8.5. Le miel.....	14
8.6. La propolis.....	14

Chapitre II : La propolis

1. Définition de la propolis	16
2. Historique.....	16
3. Origine botanique.....	17
4. Récolte de la propolis.....	18
4.1. Récolte de la propolis par les abeilles.....	18
4.1.1. Les procédés de récolte.....	18
4.1.2. Les conditions de récolte.....	19
4.2. Récolte de la propolis par l'Homme.....	20
5. L'utilisation de la propolis.....	20
5.1. Utilisation de la propolis par l'abeille.....	20
5.2. Utilisation de la propolis par l'homme.....	22
6. Propriétés physico-chimiques de la propolis.....	22
6.1. Propriétés physiques.....	22
6.1.1. Consistance.....	22
6.1.2. Couleur.....	22
6.1.3. Saveur.....	23
6.1.4. Odeur.....	23
6.2. Propriétés chimiques.....	23
6.2.1. Solubilité.....	23
6.2.2. Point de fusion.....	23
6.2.3. Densité.....	24
7. La composition de la propolis.....	24
8. Propriétés thérapeutique.....	25
9. Toxicité	28
10. La conservation	28

Chapitre III : Les bactéries lactiques et les probiotiques

I- Généralités sur les bactéries lactiques.....	30
II- Utilisation industrielles des bactéries lactiques.....	33
III- Les lactocoques.....	34
III-1- Généralités sur les lactocoques.....	34
III-2- Principaux caractères.....	34
III-3- Habitat des lactocoques.....	37
III-4- Caractères biochimiques et nutritionnels des lactocoques.....	37
III-4-1- Besoins nutritionnels.....	37
III-5- Activité antimicrobienne des lactocoques.....	39
III-5-1- Action des acides organiques.....	39
III-5-2- Action de diacétyle.....	39
III-5-3- Action des bactériocines.....	39
III-5-3-1- Définition.....	39
III-5-3-2- Classement des bactériocines.....	40
III-5-3-3- Caractéristiques des bactériocines.....	41
III-5-3-4- Mode d'action des bactériocines	42
III-5-3-5- Utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire.....	43
IV- Les probiotiques.....	43
IV- 1- Historique et définition des probiotiques.....	43
IV-2- Démarche générales de sélection des probiotiques	44
IV-3- Effet des probiotiques sur la santé humaine.....	46
IV- 4- Evaluation du risque sanitaire des probiotiques sur la santé humaine	47

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1.1.Objectif de l'étude.....	50
1.2.Echantillonnage.....	50
1.2.1. La propolis fraiche.....	50
1.2.2. La propolis commercialisée.....	50
1.3.Méthodes d'analyse.....	51
1.3.1. Conditions du travail.....	51
1.3.2. Préparation des échantillons.....	52
1.3.3. Préparation de la solution mère et les dilutions décimales.....	55
1.3.4. Préparation du milieu M17.....	55
1.3.5. Préparation d'eau physiologique.....	55
1.3.6. Recherche et dénombrement des lactocoques.....	55
1.3.7. Isolement des lactocoques.....	56
1.3.7.1. Repiquage.....	56
1.3.7.2. Purification des souches.....	57
1.3.8. Identification des isolats.....	57
1.3.8.1. Etude morphologique.....	57
1.3.8.1.1. Caractérisation macroscopique.....	57
1.3.8.1.2. Caractérisation microscopique.....	57
1.3.8.2. Test de mobilité.....	59
1.3.3.8.3. Identification biochimique des isolats.....	59
• Test de catalase.....	59
• Test de croissance dans différents conditions.....	59
✓ Croissance dans différentes concentrations de Nacl.....	59
✓ Croissance dans différentes températures.....	60
✓ Croissance dans un milieu à pH 9,6.....	60
• Test de thermorésistance.....	60
• Recherche du type fermentaire.....	61
• Profile fermentaire.....	62

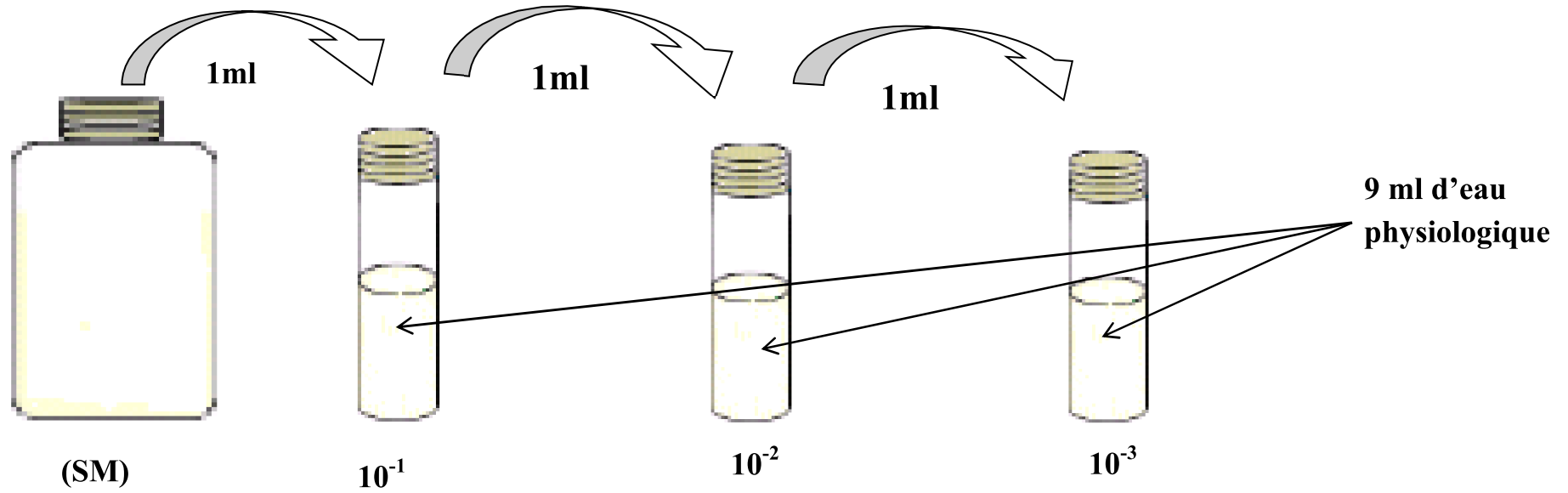
1.4.9. Mise en évidence d'une interaction entre les lactocoques et les bactéries pathogènes.....	62
1.4.9.1. Préparation des précultures des lactocoques et les bactéries pathogènes	62
1.4.9.1.1. Préparation des précultures des lactocoques.....	62
1.4.9.1.2. Préparation des précultures des bactéries pathogènes.....	62
1.4.9.1.3. détection de l'activité bactéricide des lactocoques contre E. Coli	63
1.4.10. Conservation des souches lactiques.....	65
1.4.10.1. Conservation à courte durée.....	65
1.4.10.2. Conservation à longue durée.....	65

Chapitre II : Résultats et discussion

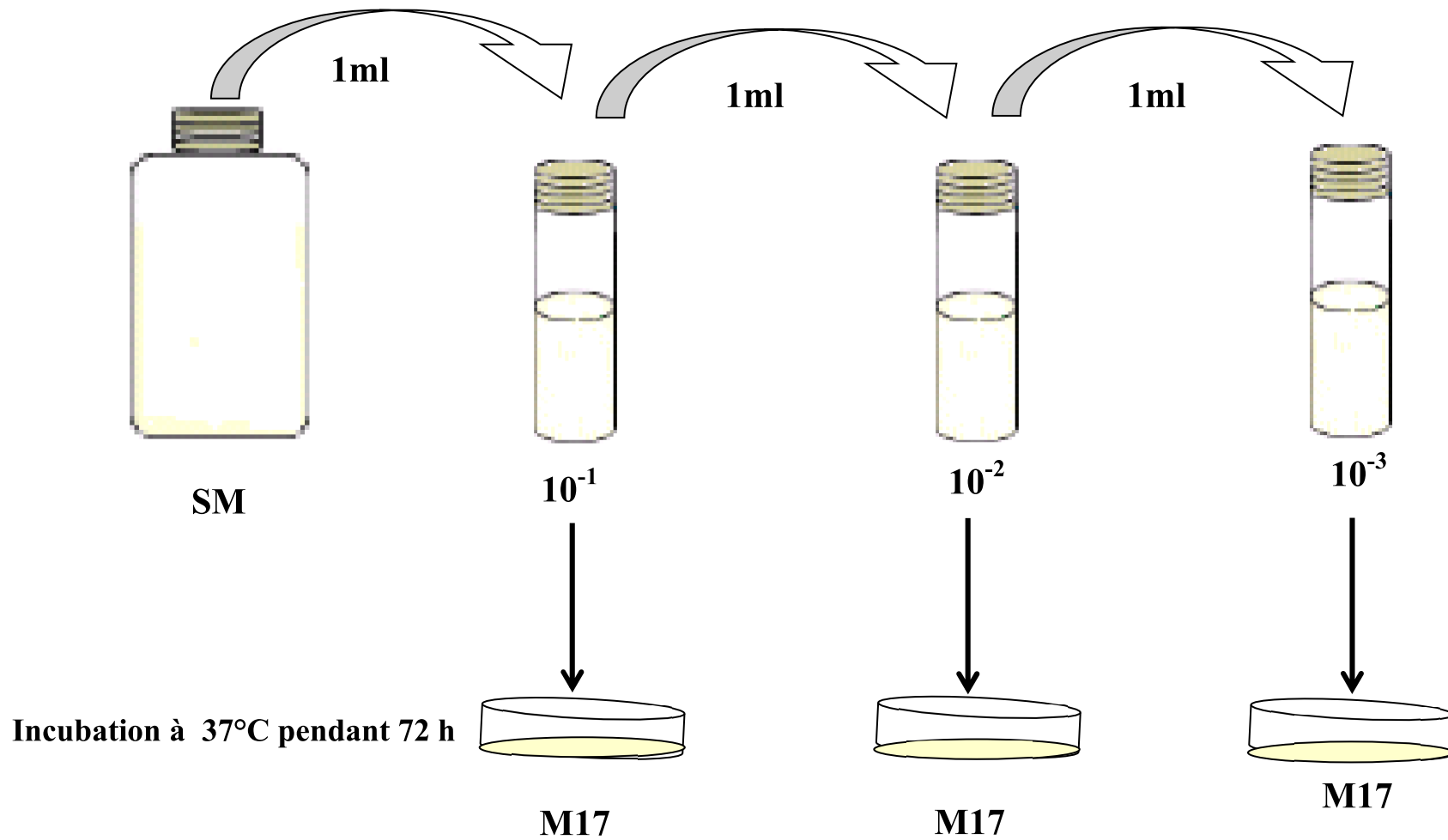
1.1. Dénombrement des lactocoques	68
1.2. Isolement des souches lactiques.....	68
1.2.1. Le repiquage.....	68
1.2.1.1. Le repiquage sur gélose M17.....	68
1.2.1.2. Le repiquage sur Bouillon M17.....	69
1.2.1.3. Le repiquage dans l'eau physiologique.....	69
1.2.2. La purification des souches.....	70
1.3. Identification des isolats.....	70
1.3.1. Etude morphologique.....	70
1.3.1.1. Aspect macroscopique.....	70
1.3.1.2. Aspect microscopique.....	71
1.3.1.2.1. Coloration du Gram.....	71
1.3.1.2.2. Coloration au bleu de méthylène.....	71
1.4. Test de mobilité.....	72
1.5. Identification biochimique des isolats.....	72
1.5.1. Test de catalase.....	72
1.5.2. Croissance à différentes conditions.....	72
1.5.2.2. Croissance à différentes concentrations de Nacl.....	72
1.5.2.3. Croissance dans différentes températures.....	73
1.5.3. Croissance dans un milieu à pH 9,6.....	74
1.6. Fermentation des sucres.....	74
1.7. Test de thermorésistance	76

1.8.Type fermentaire.....	77
1.9.Mise en évidence d’une interaction entre les lactocoques et une souche pathogène (E. Coli).....	79
Discussion.....	82
Conclusion.....	87
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

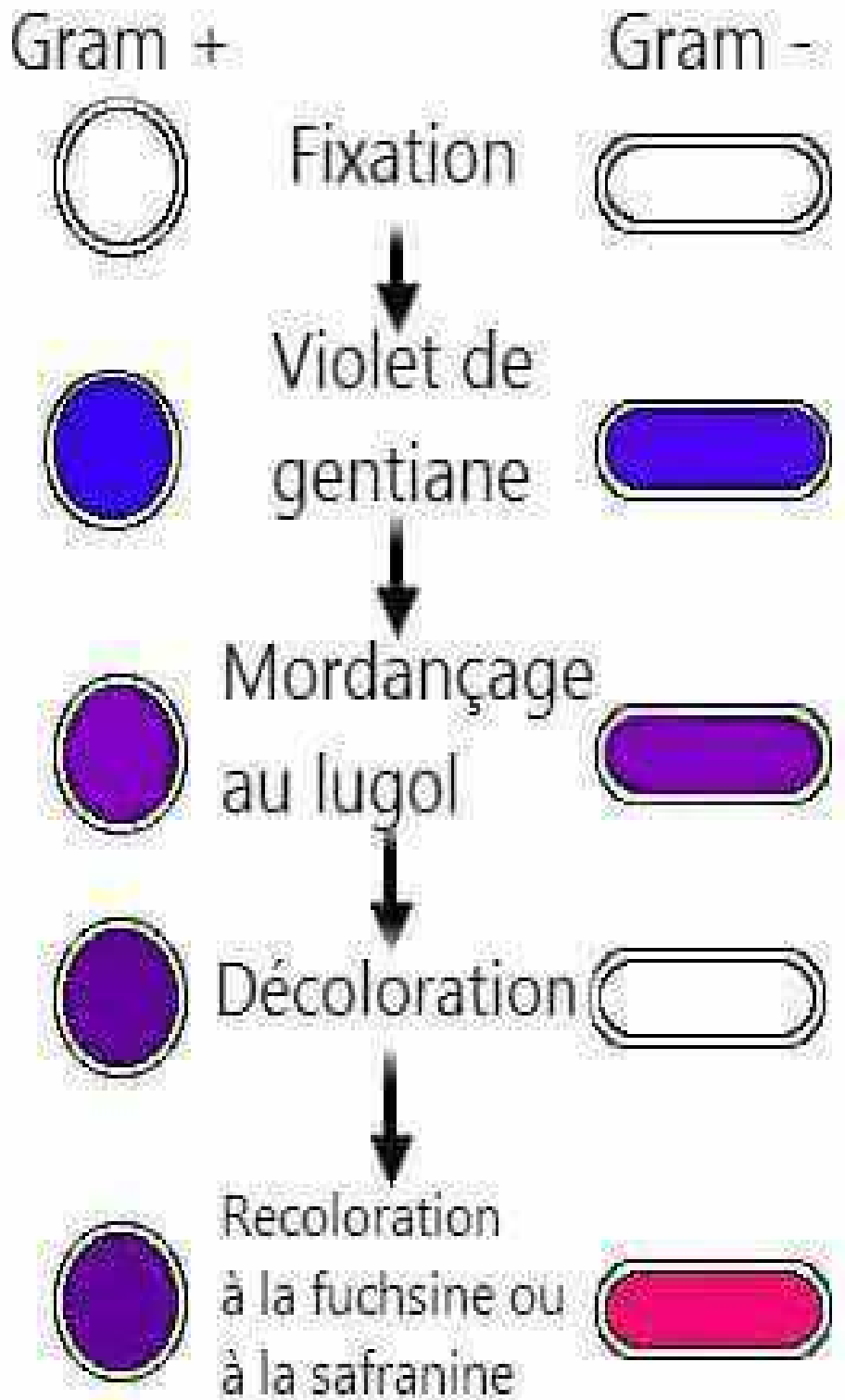
Annexe 06: Préparation des dilutions décimales



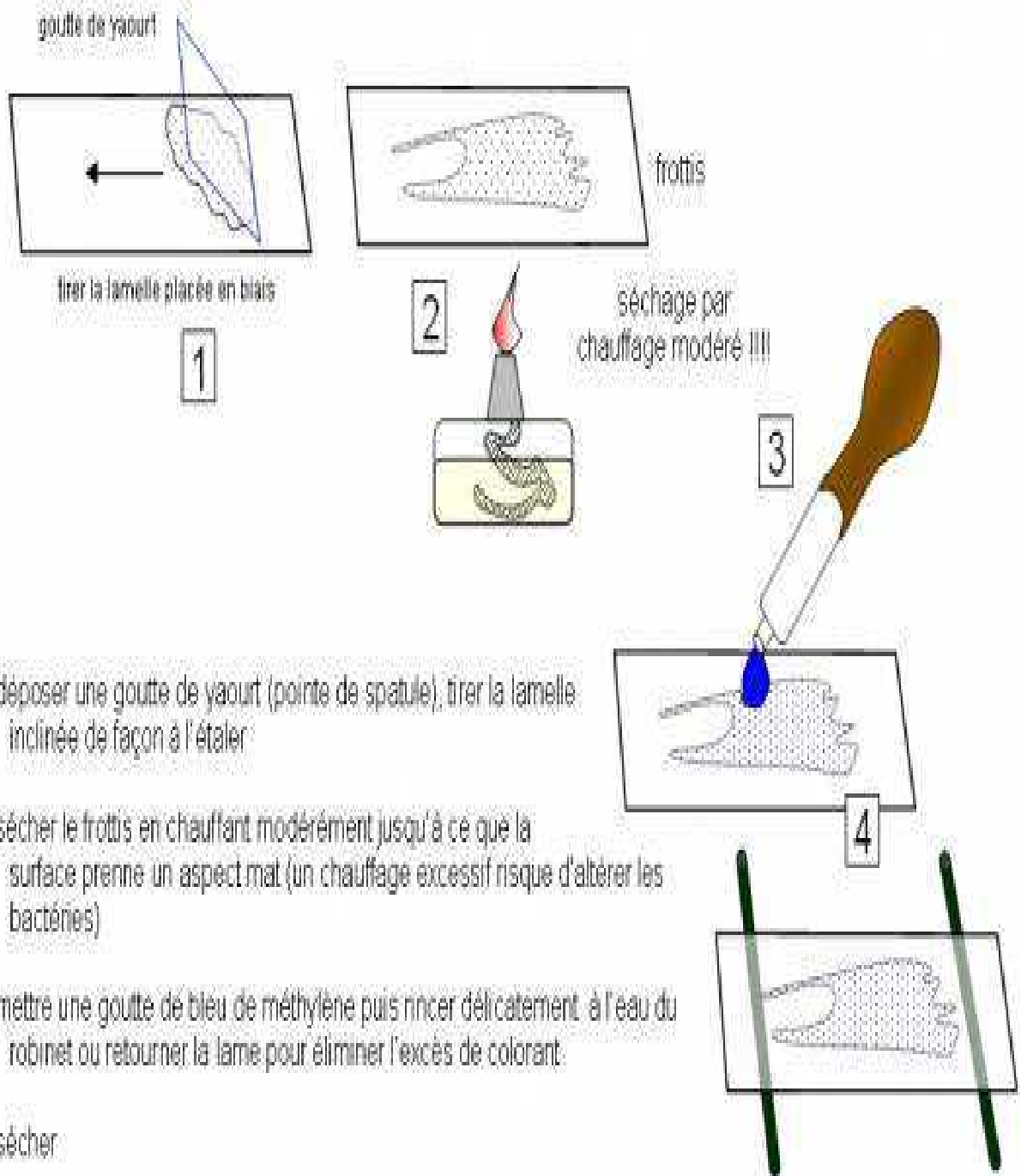
Annexe 07: Recherche et dénombrement des lactocoques



Annexe 08 : Le coloration de Gram

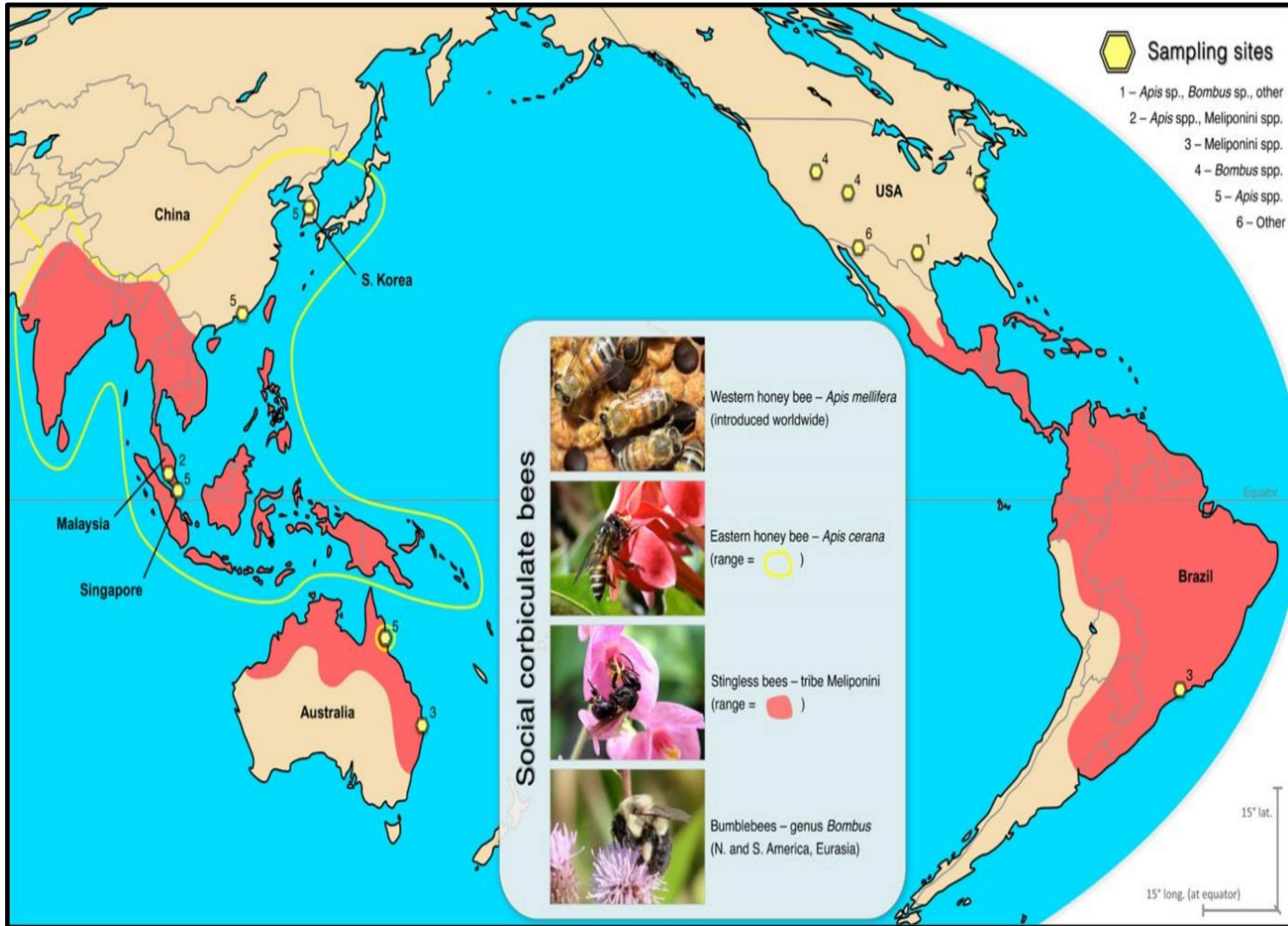


Annexe 09: La coloration de bleu de méthylène

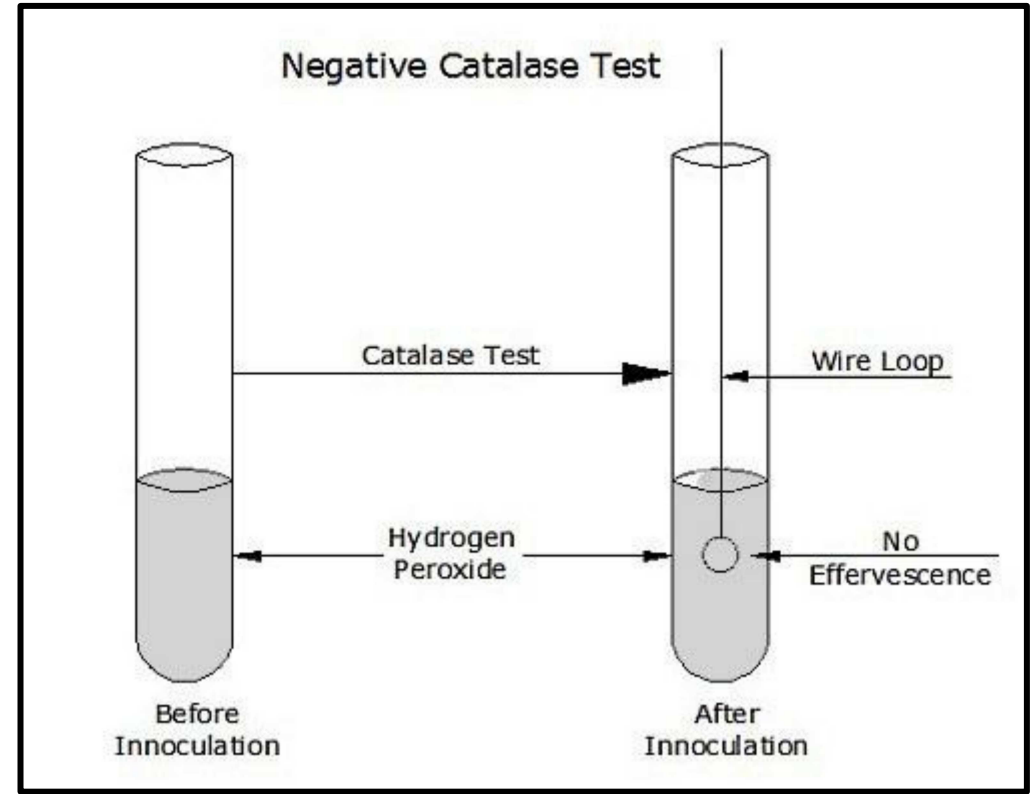
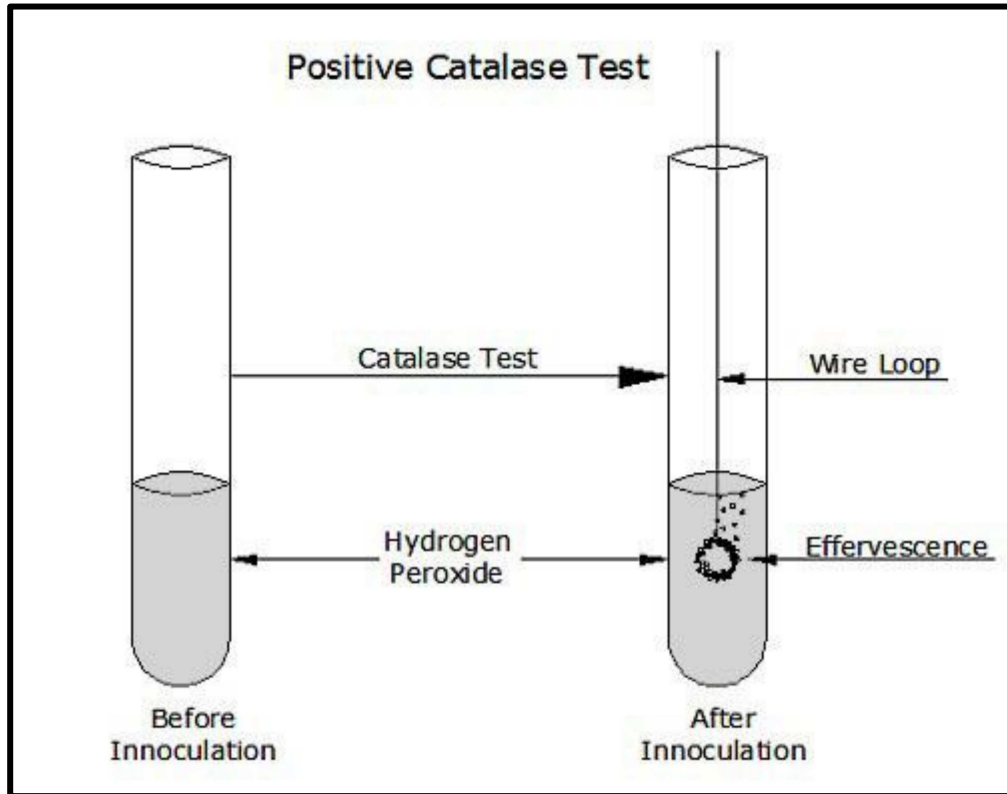


1. déposer une goutte de yaourt (pointe de spatule), tirer la lamelle inclinée de façon à l'étaler
2. sécher le frottis en chauffant modérément jusqu'à ce que la surface prenne un aspect mat (un chauffage excessif risque d'altérer les bactéries)
3. mettre une goutte de bleu de méthylène puis rincer délicatement à l'eau du robinet ou retourner la lame pour éliminer l'excès de colorant.
4. sécher
5. observer au microscope sans lamelle

Annexe 10 : La répartition géographique des *Apis* dans le monde



Annexe 11 : Test de catalase



1. Étude de l'abeille

L'abeille est un insecte vivant en société, celle-ci étant caractérisé par la division et la spécialisation du travail (**Biri., 1999**).

Vu le rôle que joue l'abeille dans le domaine agricole et l'intérêt économique dont elle est capable. Nous sommes intéressées donc à cet insecte pour apporter notre humble contribution à connaître cet insecte presque parfait.

2. Taxonomie

- **Règne** : Animal
- **Sous règne** : Métazoaires
 - * Animal pluricellulaire
 - * Coelomates (pourvu d'un coelome : cavité comprise entre le tube digestif et la paroi du corps et tapissée dans l'abdomen par un tissu qui constitue le mésentère.
- **Embranchement** : Arthropodes
 - * Invertébrés
 - * Symétrie bilatérale
 - * Le tégument rigide : une croissance par mue et une structure articulée
 - * Corps segmenté
- **Sous embranchement** : Mandibulates
 - * Une ou plusieurs antennes articulées
 - * Mâchoire
 - * Mandibules
- **Classe** : Insectes
 - Corps divisés en trois parties :
 - * Tête
 - * Thorax
 - * Abdomen

- **Ordre** : Hyménoptères
 - * 2 paires d'ailes membraneuses
 - * Métamorphose complète
 - * Appareil buccal
 - ✓ Mandibule broyeuse
 - ✓ Lèvre inférieure et mâchoire transformées en lécheuse
- **Super famille** : Apides
- **Famille** : Apidae
- **Tribus** : Apinéz
- **Genre** : *Apis* : ce genre comprend 4 espèces d'abeilles.
- **Espèce** :
 - * **Apis florea** : (**Abeille naine**), rencontré uniquement en plaine, en dessous de 500m, le nid est composé d'un seul rayon.
 - * **Apis dorsata** : (**Abeille géante**), le nid est formé d'un seul rayon.
 - * **Apis cerana** : la plus proche de l'abeille européenne, rencontré partout où les abeilles peuvent s'installer ou l'élève facilite dans les ruches.
 - * **Apis mellifera** : ou la retrouve dans toutes les contrées elle a été introduite (**Biri., 1999**).

3. Les races des abeilles



Figure 01 : *Apis dorsata*.



Figure 02 : *Apis mellifera*.



Figure 03 : *Apis florea*.



Figure 04 : *Apis cerana*.

IV- L'organisation sociale

La colonie d'abeille est composée de 30 000 à 50 000 individus avec environ 95% d'ouvrières et 5% de mâles ou faux-bourçons. (Von Frisch., 1977). Ces individus correspondent à la descendance d'une mère unique, la reine. Celle-ci est totalement investie dans la reproduction, elle pond jusqu'à 2000 œufs par jour (Bull., 1983). Les mâles haploïdes résultent du développement d'un ovule non fécondé par parthénogenèse arrhénotoque. Les femelles résultent d'œufs fécondés et sont diploïdes (Adam et al., 1977).

La société d'abeilles domestiques est établie dans un nid fonctionnel composé de milliers d'alvéoles hexagonales en cire qui lui procure une interface pour les diverses interactions entre les individus (Wilson., 1971).

IV-1-La reine :

C'est la mère de toutes les abeilles. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, elle ne dirige en rien la ruche, elle est au contraire l'esclave de la ruche. Son rôle consiste à pondre sans arrêt matin et soir, jusqu'à la fin de sa vie. Cependant, un autre rôle important de la reine est de sécréter sur son abdomen une phéromone ; celle-ci circule parmi toutes les abeilles de la colonie par trophallaxie (c'est l'échange de la nourriture et les abeilles étrangères tentant de pénétrer dans la ruche sont refoulées). Cette phéromone inhibe également la maturation des ovaires chez les Ouvrières. (Winston et Punnett., 1982).

Elle est facilement reconnaissable par son abdomen et son thorax plus développés que ceux des ouvrières (Le Conte., 2004) Elle mesure en moyenne 16 mm de long et son thorax atteint 4,5 mm de diamètre (Biri., 2010) Elle pèse entre 178 et 298 mg (Wendling., 2012).

Figure 05 : Reine et sa cour

La reine, marquée en jaune, est reconnaissable par son thorax plus large et moins poilu, ainsi que par son abdomen plus développé. (Le Conte., 2004)

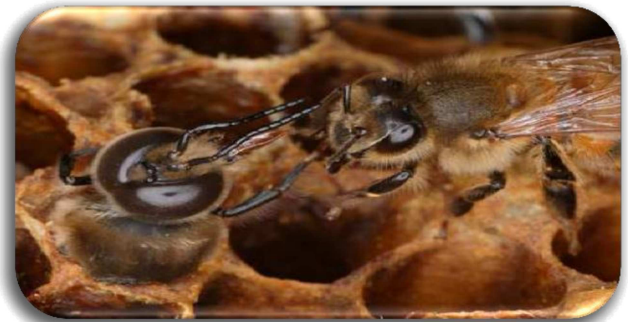


IV-2- Les Faux-bourdons :

Individus mâles, leur seule fonction est la fécondation d'une reine, ce qui aboutit à leur mort. Ils se caractérisent par un corps massif (diamètre thorax de 5,5 mm) et peuvent atteindre 12 à 14 mm de long (Biri., 2010). Ils pèsent entre 196 et 225 mg (Wendling., 2012). Ils sont dépourvus de dard, de plaques cirières et du système collecteur de pollen de la troisième paire de pattes. En revanche, leurs yeux composés sont nettement plus développés : 7 500 facettes contre 4 500 chez l'ouvrière, ce qui est indispensable pour repérer une reine à grande distance. Ils sont présents dans la colonie au printemps et à l'été. Ils participent à de grands rassemblements de faux-bourdons provenant de plusieurs colonies différentes pour tenter de féconder les jeunes reines. Ils se nourrissent des réserves de la ruche mais arrivé l'automne, quand les ressources alimentaires s'amenuisent, les ouvrières commencent à les chasser puis à les tuer (Le Conte., 2004).

Figure 06 : Naissance d'un faux bourdon

Une ouvrière accueille le nouveau-né et le nourrit par un échange buccal. On distingue nettement la différence de taille des yeux à facettes de l'ouvrière (à droite) et du faux-bourdon (à gauche) (Le Conte., 2004).



IV-3- Les ouvrières :

Elles sont plusieurs dizaines de milliers dans la colonie. Plus petite que la reine, une ouvrière mesure en moyenne 10 à 12 mm de long pour 4 mm de diamètre de thorax (Biri., 2010). Elle pèse entre 81 et 151 mg (Wendling., 2012). Deux catégories se succèdent au cours de l'année : les abeilles d'été qui vivent environ quarante jours (entre trois et six semaines) et les abeilles d'hiver qui survivent jusqu'au printemps suivant, soit quatre à cinq mois. Les abeilles d'été voient leurs tâches évoluer en fonction de leur âge (présentation par ordre chronologique ; Le Conte., 2004)

- Les nettoyeuses
- Les nourrices
- Les bâtisseuses
- Les manutentionnaires
- Les ventileuses
- Les gardiennes et les soldats

Figure 07 : Ouvrière qui butine une fleur de colza

La corbeille située sur la troisième paire de pattes est remplie d'une pelote de pollen.

Le nectar de la fleur est aspiré et stocké dans le jabot. (Le Conte., 2004)



V- La morphologie générale des abeilles

Le corps est divisé en trois parties : tête, thorax et abdomen (fig : 8). Il est recouvert d'une membrane externe de chitine, appelée cuticule, qui forme l'exosquelette, lui-même pourvu de poils et soies robustes. A proximité des articulations, cette couche gagne en souplesse pour permettre les mouvements initiés par les muscles insérés sur la face interne de la cuticule. (Biri., 2010 ., Le Conte., 2004)

La tête : (fig : 8 et fig : 9), de forme ovoïde, porte une paire d'yeux composés et trois ocelles (organes visuels), une paire d'antennes (organes olfactifs et tactiles) et les pièces buccales (appareil buccal de type broyeur-suceur formé de deux mandibules et d'une trompe). Son axe forme un angle de 90° avec celui du reste du corps. Elle est reliée au thorax par un premier rétrécissement, le cou. (Biri., 2010 ., Le Conte., 2004)

Le thorax : (fig : 8) est composé de trois segments thoraciques (segments I, II et III) et d'une extension du premier segment abdominal (segment 1). Il porte les éléments locomoteurs : trois paires de pattes articulées et deux paires d'ailes membraneuses. Un dispositif de stabilisation, formé d'une gouttière et de crochets, permet aux deux paires d'ailes de fusionner pour n'en former qu'une seule. Chez l'ouvrière, la troisième paire de pattes comprend sur la face externe une corbeille utilisée pour stocker le pollen, et sur la face interne, un peigne et une brosse à pollen, outils aidant au déchargement de la récolte. Chaque segment porte un orifice respiratoire appelé stigmate. Le thorax est relié à l'abdomen par un deuxième rétrécissement, le pétiote. (Biri., 2010 ., Le Conte., 2004).

L'abdomen : (fig : 8) comprend six segments (segments 2 à 7) composés d'une plaque inférieure, le sternite, et d'une plaque supérieure, le tergite. Ils sont reliés entre eux par la membrane inter segmentaire, une membrane souple qui permet des mouvements d'extension et de repli de l'abdomen. Chaque segment porte une paire de stigmates. Chez l'ouvrière, les tergites du quatrième, cinquième, sixième et septième segment portent les glandes cirières. L'organe de Nasanov, glande productrice de phéromones, se situe sur les sternites 6 et 7. (Biri., 2010 ., Le Conte., 2004). L'intérieur de l'abdomen comprend une grande partie des appareils respiratoire, digestif et reproducteur, ainsi que l'organe venimeux pour les femelles. Le dernier segment porte l'appareil vulnérant (fig : 9).

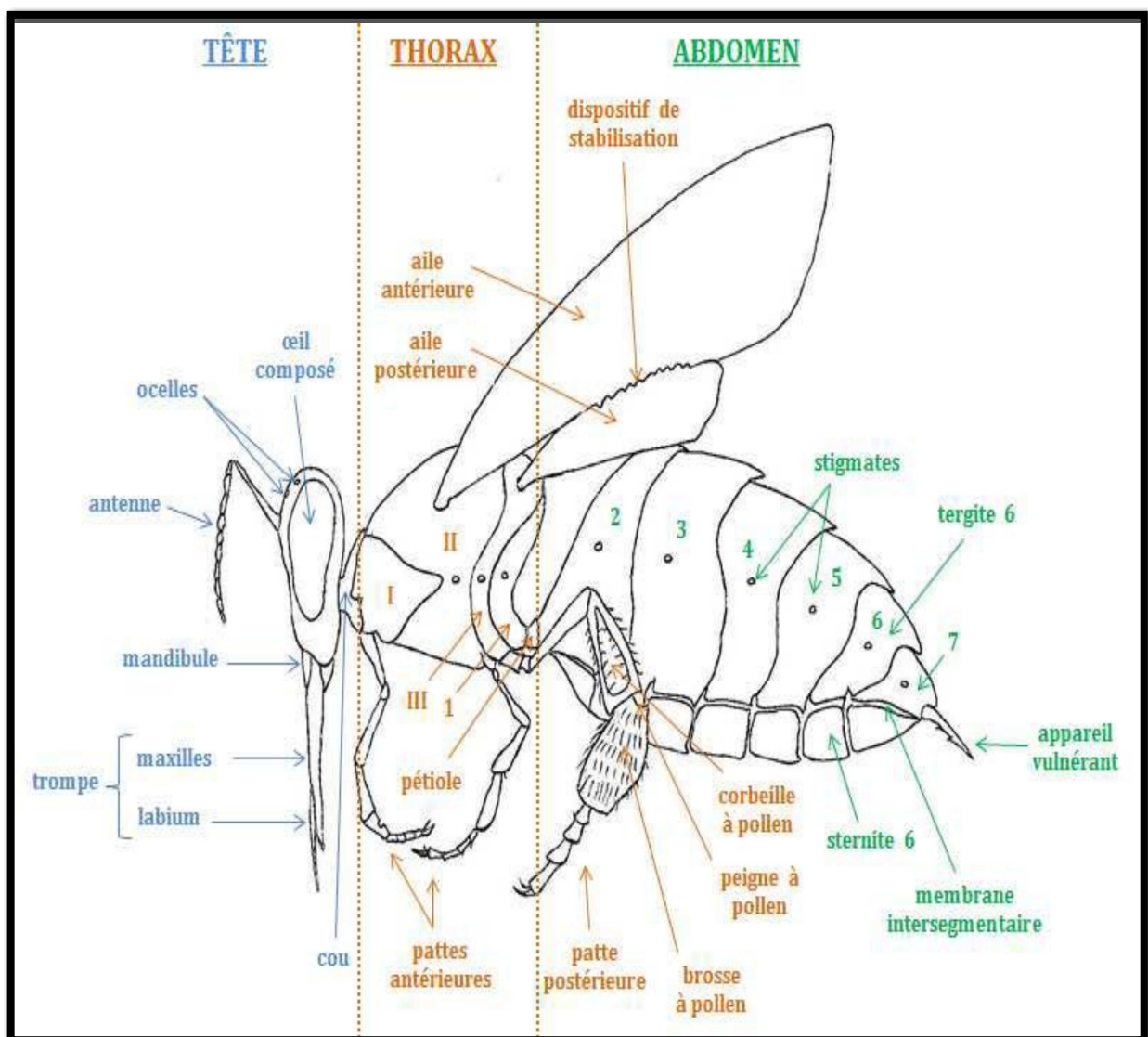


Figure 08 : Morphologie externe de l'abeille femelle adulte (légendes d'après PAILLOT et al., 1949).

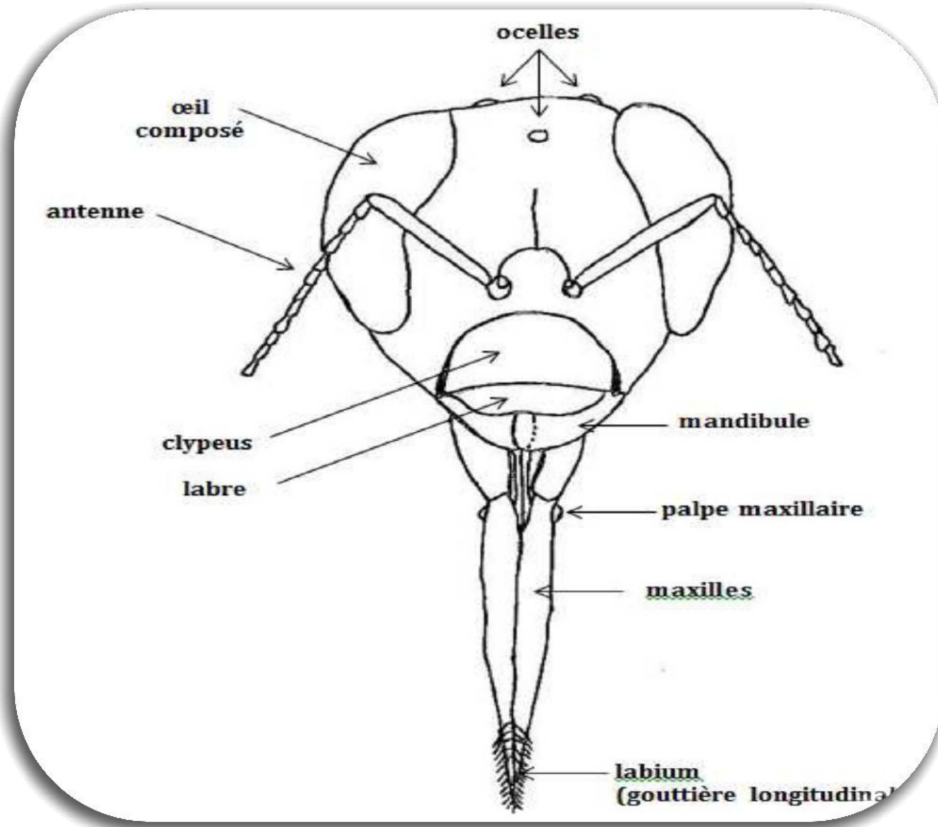


Figure 9 : Schéma de la tête d'une abeille adulte (légendes d'après PAILLOT et al., 1949).



Figure 10 : Appareil vulnérant d'un individu femelle (Le Conte., 2004).

VI-Répartition géographiques des abeilles mellifères :

L'abeille appartient à la classe des insectes. La plus répandue dans le monde est *Apis mellifera*, qui s'étend depuis la pointe sud des savanes africaines, passant par la méditerranée jusqu'à atteindre la limite de son expansion en Europe du nord et en Scandinavie du sud. Une telle variété d'habitat, de conditions climatiques et de flore, a permis l'apparition de nombreuses sous espèces ou races géographiques qui sont interfécondes, chacune avec ses caractéristiques morphologique et physiologique adaptées à chaque région (**Chauvin., 1968**). La race présente en Algérie *Apis mellifera intermissa* est également appelée abeille tellienne. *Apis mellifera sahariensis*, ou abeille saharienne, a été décrite par (**Haccour., 1961**). C'est une abeille jaune de petite taille, à indice cubital élevé. Elle est peu agressive et possède une résistance remarquable aux conditions difficiles du milieu. Elle se retrouve au sud du Maroc et de l'Algérie (**Voir Annexe 10**).

VII- Le rôle des abeilles :

Pour dire à quel point l'abeille domestique nous est précieuse, il suffit de rappeler qu'une majorité de plantes à fleurs sont partiellement ou totalement pollinisées par elle, en effet, les abeilles constituent un élément clef de l'écosystème par son rôle de pollinisateur (**Celli et al., 2002**). Et parmi les rôles très importants des abeilles dans la nature nous pouvons citer les rôles suivants :

VII-1- Rôle biologique

Pour remplir son jabot de 70mg de nectar, l'abeille doit parfois visiter plus de mille fleurs ; en une heure une butineuse visite ainsi 600 à 900 fleurs (et parfois bien plus). Sur les milliers et les milliers de fleurs qu'elle visite, la butineuse transporte des grains de pollen, favorisant l'autopollinisation et allopollinisation. (**Toullec., 2008**).

VII-2- Rôle économique

En butinant à la recherche de nectar et de pollen, l'abeille participe activement à la pollinisation de flore sauvage : aubépine (*Crataegus oxyacantha*), églantier (*Rosa canina*), sorbier (*Sorbus domestica*) mais également des plantes cultivées, favorisant ainsi leur reproduction et améliorant les récoltes (**Toullec., 2008**).

VII-3- Rôle de bio indicateur

L'abeille peut également être utilisée comme bio indicateur de la santé de l'écosystème dans lequel elle évolue .En effet, les butineuses explorent une grande zone de plusieurs kilomètres carrés autour de la ruche et y rapportent leur récolte .En observant la mortalité et en détectant les résidus de pesticides, métaux lourds ou molécules radioactives dans l'environnement (Toullec., 2008).

VIII- Les produits de la ruche :

VIII- 1-La gelée royale

La gelée royale est le produit de sécrétion des glandes hypo pharyngiennes et mandibulaires des ouvrières âgées de 5 à 14 j , elle se présente sous la forme d'une matière visqueuse ,blanchâtre , à odeur phénolique et acide (Khenfer et al.,2001).

Elle constitue la nourriture de toutes les larves jusqu'au 3^{ème} jour et de la reine durant toute sa vie. Elle se compose de 12% de protides, 12%de glucides, 5%de lipides et 65% d'eau, elle apporte 140 calories aux 100g (Jansegers., 2007).

VIII- 2-Le pollen

Le pollen est l'aliment fécondant male d'une fleur qui se trouve sur les anthères des étamines (Straub., 2007) Parfois appelé « pain d'abeille », il constitue la seule source de protéines de la colonie les apiculteurs le récoltent en « piégeant » les abeilles dans des chicanes à la rentrée dans la ruche .Il se compose de 41% de glucides, 30% de protides, 5% de lipides. Il apporte 320calories aux 100g (Jansergers., 2007).

VIII- 3-La cire

La cire est le produit de sécrétion des glandes cirières de l'abeille ouvrière, du 13^{ème} au 18^{ème} j de son existence, c'est une matière grasse qui se solidifie sous forme de fines lamelles presque transparente (Khenfer al., 2001) sert de matériaux de construction des cellules ou alvéoles hexagonales dont sont faits les rayons de la ruche, véritables merveilles d'architecture (Jansergers., 2007).Cette substance est inoxydable et insoluble dans l'eau (Straub., 2007).

VIII-4- Le venin

Le venin est sécrété par deux glandes situées dans l'abdomen et est conservé dans un réservoir à venin. Lorsqu'une abeille pique, le venin est pompé dans la victime à l'aide d'aiguillon **(Leven et al., 2005)**. Il contient de nombreuses substances chimiques, nous citerons seulement :

-Mellitine 50%.

-Histamine 1%.**(Khenfer et al., 2001)**.

VIII-5- Le miel

Le miel est la substance sucrée produite par les abeilles à partir du nectar de plantes ou à partir de sécrétions provenant de parties vivante de plante, transformée et combiné avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, et laissent affiner et murir dans les rayons de la ruche **(Crane., Vesscher., 2009)**.

VIII-6-La propolis

Substance jaunâtre que les abeilles utilisent pour colmater les fissures, possède des propriétés antimicrobiennes, fongicides et antibiotiques remarquable **(Jansergers., 2007)**.

1. Définition de la propolis :

Le mot propolis est d'origine grec qui signifie "pro" : en avant et "polis" : cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche "devant la cité". Son étymologie viendrait aussi du verbe latin propolire qui signifie « enduire ». En effet, l'abeille enduit l'intérieur de son habitat de cette résine pour se protéger des agressions microbiennes. Son usage remonte à plusieurs millénaires et elle est surtout réputée pour ses propriétés antibactériennes, immunostimulantes et cicatrisantes (**Castaldo., Capasso., 2002**).



Figure 11: Propolis brut.

2. Historique :

La propolis a été largement utilisée par l'homme depuis l'antiquité en particulier dans la médecine populaire pour traiter ou soulager plusieurs maladies. Elle est déjà connue à des prêtres de l'Égypte antique où elle servait à momifier les cadavres, la propolis fut très certainement utilisée par les Grecs anciens puisque Aristote la signale comme un remède aux affections de la peau, plaies et suppurations dans son « Histoire des animaux ». Les Romains l'ont donné à tous les soldats pour soigner leurs blessures pendant les différentes invasions. Les anciens textes grecs rapportent que les médecins l'utilisaient pour la fabrication de baumes. (**Golder., 2004 ., Volpert., Elstner., 1993**).

Dans un texte coranique, nous avons relevé ce paragraphe qui fait allusion à la propolis :

« Habite les montagnes, les arbres et les ruches, puis mange de tous les fruits et suit humblement les voies de ton Seigneur. Il sort de leur ventre une boisson de diverses couleurs salubre pour les Hommes. En cela il y a un signe pour les gens qui réfléchissent ».

(Sourate : L'abeille, Verset : 68-69).

Les ouvrages du Moyen Âge européen décrivent même les préparations médicales à base de propolis pour les traitements des maladies de la sphère ORL et de la respiration.

Son activité anesthésiante reconnue permet à cette époque la chirurgie des fentes labiales chez l'enfant.

A la fin du XIX^{ème} siècle, la propolis était en plein essor grâce à ses vertus médicinales, employée sous forme d'onguent, d'emplâtre, de lotion ou de fumigation. De nos jours, elle est utilisée surtout en Europe de l'est, au Brésil, en Asie et notamment au Japon. **(Blanc., 2010).**

Parmi les usages non médicaux, nous citons son emploi comme vernis pour le traitement des violons, ce qui leur donne un meilleur son et les protège contre le ver de bois. **(Marcucci., 1995 ; Prost., 1979 ; Viel., 2003).**

3. Origine botanique :

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille. Tout cela explique que l'on trouve des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges. L'abeille va aller chercher sa résine dans son écosystème et c'est bien de cet écosystème que va dépendre la composition de la propolis **(Burdock., 1998).**

Les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont représentées par différents conifères (pin, sapin, épicéa) et plusieurs espèces de peupliers (qui semblent la source la plus importante **(Burdock., 1998).**

En Algérie, on peut déduire que notre propolis est d'origine soit du pin (*Pinus* sp) qui occupe les zones semi arides, le chêne (chêne liège et chêne zeen) qu'on trouve au nord-est du

pays, châtaignier, Cyprés (*Cupressus* sp), casuarina, et le peuplier (*Populus* sp) (Moudir., 2004).

4. Récolte de la propolis :

La récolte de la propolis s'effectue d'abord par les abeilles et ensuite par l'homme (Donadiou., 1981).

4.1. Récolte de la propolis par les abeilles

La propolis est récoltée durant tout l'été jusqu'à la fin de l'automne, par les ouvrières butineuses, Ces ouvrières sont certainement très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie, si ce n'est un travail en relation directe avec cette récolte, à savoir le colmatage à l'intérieur de la ruche (Donadiou., 1981).

A- Les procédés de récolte

La récolte de la propolis par les abeilles s'effectue suivant quatre étapes :

- A l'aide de ses antennes, l'abeille repère un morceau de propolis, puis avec ses mandibules elle en détache un fragment en s'aidant parfois de ses pattes antérieures.
- Le morceau de propolis modelé par les mandibules est pris avec les pattes antérieures.
- Celui-ci est alors transféré aux pattes du milieu
- Par un mouvement rapide la propolis est finalement déposée dans la corbeille des pattes postérieures (Fig09), où elle est transportée jusqu' à la ruche (Donadiou., 1981 ; Debuyser., 1984).

Toutes ces opérations demandent du temps mais se passent avec beaucoup de dextérité de la part de l'abeille qui n'est pas gênée du tout par la manipulation de ce matériau gluant, Une fois la propolis rapportée à la ruche, les abeilles ouvrières vont étirer cette pelote pour en faire un fil. Elles vont y ajouter de la cire et des sécrétions salivaires pour obtenir la propolis (Donadiou ., 1981 ; Debuyser., 1984)



Figure 12 : Récolte de la propolis par L'abeille (Warré., 2005).



Figure 13 : Butineuses de propolis dans la ruche. (Warré., 2005).

B- Les conditions de récolte

Cette récolte dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons dégager et analyser les plus notables (Donadiou., 1981 ; Debuyser., 1984).

- **L'âge de l'abeille** : il semble que ce soient les abeilles les plus âgées donc les plus expérimentées qui récoltent la propolis. L'étude histologique montre que leurs glandes cirières sont totalement atrophiées, l'âge minimal est de dix-huit jours (Debuyser., 1984).

- **La race** : La tendance à propoliser dépend de la race d'abeille. Il est reconnu que l'abeille grise des montagnes appelée encore Caucasiennne (*Apis mellifica caucasia*) et certaines autres races d'Asie Mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent en général davantage que les autres, c'est le cas de l'abeille carniolienne (*Apis mellifica carnica*) et l'abeille Tellienne (*Apis mellifera*) (Debuyser., 1984).

Mais dans de nombreux autres cas, les données d'information en ce qui concerne ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises.

- **La saison** : La récolte a lieu, soit en début de printemps, mais le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche d'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage (Debuyser., 1984).

- **Le climat (dont la température)**: Les abeilles récolteuses de propolis déploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température le plus souvent supérieure à 20°C) et en outre, pendant les heures les mieux exposées, à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en

moyenne), ceci du fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.

- **La géographie :** C'est ainsi, entre autres, que les ruches situées dans les régions boisées propolisent davantage que les ruches de plaine (Debuyser., 1984).

4.2. La récolte de la propolis par l'apiculteur

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses :

- Par raclage et grattage des cadres (fig.16) ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis alors dure et friable se détachant mieux (Debuyser., 1984).
- Par des grilles spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité (Debuyser., 1984).



Figure 14 : Récolte de la propolis sur grilles.



Figure 15 : Récolte de la propolis par grattage.

5. L'utilisation de la propolis

5.1. L'utilisation de la propolis par l'abeille

L'abeille *Apis mellifera* se servent de la propolis pour protéger leurs nids de l'humidité, des courants d'air, pour les isoler du danger et en maintenir l'hygiène. Les *Apis mellifera* nichent dans la nature, par exemple dans les arbres creuse dont les parois intérieur sont soigneusement vernies de propolis. La propolis sert ainsi à colmater les fissures où les

microorganismes pourraient se développer et ses huiles volatiles servent probablement d'antiseptique et de purificateur d'air.

Les abeilles utilisent également la propolis :

- Comme matériau de construction pour réduire la taille des entrées du nid et en lisser la surface pour le trafic des abeilles.
- En couches fines pour vernir l'intérieur des alvéoles à couvain avant que la reine y pondre les œufs, fournissant ainsi une unité résistante, imperméable et hygiénique pour le développement des larves.
- Pour embaumer les corps des souris et autres prédateurs trop volumineux que les abeilles ne peuvent éliminer et qui, en se décomposant, risqueraient d'infecter la ruche.

5.2. Utilisation de la propolis par l'homme

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

A-La médecine :

La propolis est utilisée dans divers traitements tels que :

- **Soins de la bouche :** gingivites, stomatite, aphtes, douleurs et infections dentaires, mauvaise haleine.
- **Soins réparateurs et cicatrisants.**
- **Soins apaisants :** piqûres, démangeaisons.
- **Soins anti rides.**
- **Soins des peaux à problèmes (Mathivanan et al ., 2013).**

B- Cosmétique :

La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et cosmétique. Ses effets sur la génération et la rénovation des tissus ont été bien étudiés (**Lejeune et al ., 1988**).

Le tableau I représente les différentes utilisations de la propolis dans les cosmétiques.

Tableau I : Différentes utilisations de la propolis dans les cosmétiques (**Krell., 1996**).

Fonction	Application
Agent antibactérien	Déodorants et anti-sudorifiques
Antipelliculaire et agent d'égalisation de sébum.	Shampooing et lotions pour les cheveux
Agent antimicrobien et la guérison	Produits anti-acnés et l'après rasage
Agents nettoyantes	Crèmes purifiant et lotions
Conservateur	Dans tout ce qui procède

6. Propriétés physico-chimiques de la propolis

6.1. Propriétés physiques

6.1.1. La consistance

La propolis est une substance naturelle de consistance variable suivant la température :

- À 15°C, elle est dure et friable.
- À 30°C, elle est molle et malléable.
- Entre 30 et 60°C, elle devient collante ou gluante, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C ou plus. (**Donadieu., 2008**).

6.1.2. La couleur

Très variable suivant sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toute la gamme des bruns (**Donadieu., 2008**).



Figure16 : Différentes couleurs de propolis selon l'origine de flore naturelle.

6.1.3. La saveur

Elle est souvent âcre et parfois amère. (Donadieu., 2008).

6.1.4. L'odeur

Variable selon son origine botanique : En général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient. (Donadieu., 2008).

6.2. Propriétés chimiques

6.2.1. Solubilité

La propolis est insoluble dans l'eau à froid. Elle est, en revanche, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, etc. Il importe de noter que la propolis est beaucoup plus soluble dans une solution de soude caustique à 2% (Donadieu., 2008).

6.2.2. Point de fusion

Son point de fusion se situe autour de 70°C.

Chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties :

- une partie visqueuse qui tombe au fond du récipient ;
- une partie liquide appelée cire de propolis, qui reste en surface et qui a de nombreux usages dans le domaine apicole (Donadieu., 2008).

6.2.3. Densité

La densité de la propolis est de 1,2 (soit supérieure à celle de l'eau) (**Donadieu., 2008**).

7. La composition de la propolis

Les constituants de la propolis dépendent des plantes que les abeilles ont butinées, et il est donc difficile de proposer une définition standard de la propolis, bien que certains pays aient tenté de le faire. La propolis contient normalement plus de 300 constituants : les substances les plus importantes de la propolis sont les flavonoïdes (flavones, flavonols, flavonones), les acides organiques, les aldéhydes, plusieurs alcools et d'autres molécules organiques, les minéraux, des stérols et stéroïdes, des sucres et des acides aminés sont aussi trouvés dans la propolis (**Bradbear., 2011**).

Les différents constituants identifiés à ce jour sont suivants : (**Annexe : 01**).

- Acides organiques : benzoïques et gallique.
- Acides –phénols : caféique, cinnamique, férannique, isoférannique, p-coumarinique.
- Aldéhydes aromatiques : vanilline, iso vanilline.
- Coumarines : esculetol, scopuletol.
- De très nombreux flavonoïdes :
 - Flavones : acacétine, chrysin, (à l'origine de la couleur jaune de la propolis et de la cire), Pécétolinarigénine, Pinocembrine, Tétouchrysin.
 - flavonols : galangine, izoalpinine, kaempféride, quercétine, rhamnocitrine.
 - Flavonones : pinostrobine, sakusanétine.
 - Flavononols : pinobanksine.

Ce nombre important de flavonoïdes qui ont de multiples et intéressantes propriétés thérapeutiques explique certaines actions de la propolis.

- Un grand nombre d'éléments minéraux (dont certains sous forme d'oligo-éléments) : Aluminium(Al), Argent(Ag), Baryum(Ba), Bore(B), Chrome(Cr), Cobalt(Co), Étain(Sn), Fer(Fe), Magnésium(Mg), Manganèse(Mn), Molybdène(Mo), Nickel(Ni), Plomb(Pb), Sélénium(Se), Silicium(Si), Strontium(Sr), Titane(Ti), Vanadium(V) et Zinc(Zn).
- Vitamines : carotène ou provitamine A et certaines vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B6), vitamine C et E.

- Et de nombreux autres constituants divers, parmi lesquels : le xanthorrhéol, le ptérostilbène, des lactones, des polysaccharides, des acides aminées, des acides coumariniques, gentsiques, hydrocaféiques et salicyliques.

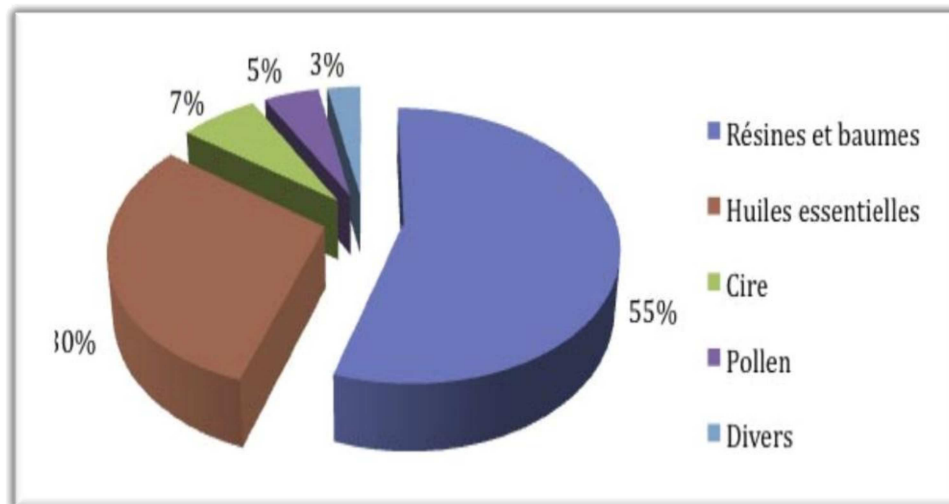


Figure 17 : La composition chimique de la propolis (Krell., 1996).

8. Les propriétés thérapeutiques de la propolis

La propolis augmente l'efficacité de certains antibiotiques utilisés en allopathie. Ces propriétés actuellement connues : antibactérienne, antivirale, antifongique, antigermaniques, anti-inflammatoire, anesthésique, régénératrice des tissus, immunologique, désodorisante et anti-oxydante, ce sont les flavonoïdes contenus dans la propolis qui lui confèrent une action puissante dans de nombreuses sphères de la thérapeutique médicale, Oto-rhino-laryngologie (ORL) et appareil respiratoire, Ophtalmologie, Stomatologie, Allergie humorale, Circulation sanguine, appareil digestif, Cosmétique et Articulations, Système endocrinien (Bankova., 2005).

- **Activité antimicrobienne :** De nombreuses études ont démontré l'effet d'inhibition de la propolis sur les souches Gram⁺, Gram⁻ et les bactéries anaérobies, Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (Ugur et Arslan., 2004).

- **Propriétés cicatrisantes :** La propolis possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène (**Ghisalberti., 1979**). De plus, elle répare en un temps record l'épiderme abîmé (régénération de tissu) (**Burdock., 1998**).
- **Propriétés anesthésiques :** La propolis est un puissant anesthésique (**Burdock., 1998**). Les études ont démontré que cette résine est 52 fois plus puissante que la cocaïne dans les tests sur les cornées de lapin (**Ghisalberti., 1979**).
- **Propriétés anti oxydantes :** La propolis possède un effet antioxydant dû à la présence de benzyle caffeate, flavonoïdes qui ont un énorme pouvoir antioxydant. De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux (**Bankova et al., 2002**).

De plus, la propolis possède un effet hépato protecteur contre la toxicité du paracétamol, du CCl₄ et de l'alcool. Ces effets sont en rapport avec les propriétés anti oxydantes de cette substance.

- **Activité antivirale :** La propolis exerce des effets inhibiteurs contre la variole bovine, la grippe, la maladie de Newcastle, le virus de l'herpès, la fièvre de la vallée du Rift, la Reovirus et le virus de la grippe de Hong Kong (**Voir Annexe 03**).

Une telle activité est attribuée à sa teneur en composées phénoliques, l'acide caféique, des esters essentiellement de l'acide caféique et férulique (3-méthyl-but-2-ényle caféate, 3-méthylbutyl férulate), et enfin, flavonique aglycones (la Lutéoline et la quercétine), qui sont très actifs contre l'herpès (**Bankova et al., 2002**).

- **Activité antifongique :** Une étude européenne à montrer que la propolis riche en trans-p-coumarique, avait une forte activité contre candida albicans, tandis que les variétés méditerranéennes (Bulgarie, Turquie, Grec et l'Algerie), qui contient des flavonoïdes, des esters, d'acide caféique et l'acide férulique, présentent une activité antifongique plus faible. D'autres études ont montré que la propolis à des effets antifongiques contre de nombreuses espèces telles que : Candida albicans, Aspergillus niger, Botrytis, Cinerea, Ascospheera apis (**Krell et al., 1998**).

➤ **Propriétés médicinales** : La propolis est un produit très complexe avec plus de 300 composants, il peut être utilisé en médecine. Les propriétés principales de la propolis sont classées par domaines (**Krell et al., 1998**) :

- **Dermatologie** : Mycose, Furoncle, Herpes, Zona, Acné, Brûlure, Plaie, Ulcères, Variqueux, Psoriasis, Alopécie, Verrue, Eczéma.
- **ORL et sphère pulmonaire** : Angine, Rhinopharyngite, Sinusite, Rhinite, Ozène, Otite, Bronchite, Pneumonie, Trachéite, Rhume, Tuberculose, Asthme.
- **Stomatologie** : Stomatite, Aphte, Gingivite, Glossite, Muguet, Carie.
- **Sphère urogénitale** : Vaginite, Adénome de la prostate, Néphrite, Cystite, Dysménorrhée, Cancer du col utérin.
- **Sphère cardiovasculaire** : Hypertension artérielle, Hypercholestérolémie, Tonifie les vaisseaux sanguins.
- **Rhumatologie** : Polyarthrite, Spondylarthrite, Tendinite.
- **Sphère gastro-entérologie** : Colite, Gastrite, Ulcère, Cholécystite, Constipation, Hépatite, Diverticulose intestinale.
- **Sphère neuropsychique** : Parkinson, Anorexie, Dépression, Diminution de la dépendance à l'alcool et au tabac.
- **Ophtalmologie** : Conjonctivite, Blépharite, Kératite, Orgelet, Ulcère cornéen.
- **Cancérologie** : Chimio mieux supportée, Synergie avec les traitements classiques, Synergie entre ses constituants, Prise seule augmente la qualité de la vie des patients, Période de survie augmentée, Prise quotidienne aurait un pouvoir inhibiteur face à certains cancers.

La propolis est aussi une substance aux propriétés :

- Anti-inflammatoire.
- Anti-tumorale.
- Anti- HIV.
- Antimutagéniques.
- Anti hypertensive.
- Hypoglycémiant.

9. Toxicité

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares. **Ghisalberti** signale qu'elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. Ont reporté une DL_{50} de 7340 mg/kg. Par contre, ont reporté une DL_{50} de 2050 mg/kg et une DL_{100} de 2750 mg/kg. Cette différence peut être expliquée par une différence au niveau de l'extraction de cette substance (choix du solvant et pourcentage utilisé). L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/J d'extrait éthanolique de propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'entraîne aucun effet nocif. De plus, l'extrait alcoolique de propolis incorporé dans l'eau potable (rat et souris) et utilisé aux doses 1875 et 2470 et 4000 mg/kg/J pendant 30, 60 et 90 jours respectivement, ne montre aucun effet toxique (**Krell., 1996**).

10. La conservation de la propolis

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions. Mais il paraît néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de préférence). De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa teneur en composants chimiques, ni ses activités biologiques (**Krell., 1996**). Cependant, pour en obtenir de meilleurs effets et résultats, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible. Il faut signaler enfin, que la lyophilisation de la propolis (dessiccation obtenue par congélation brutale à basse température, suivie d'une sublimation sous vide, permettant d'obtenir une poudre poreuse qui se conserve indéfiniment sous vide) maintient aussi ses propriétés biologiques (**Krell., 1996**).

1. Généralités sur les bactéries lactiques

Le terme « Bactérie lactique » désigne des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des substances hydrocarbonées (**Desmazeaud, 1983**) cité par **Amrouche (2003)**.

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Non pathogènes, à quelques exceptions près, la majorité de bactéries lactiques sont GRAM positives (G+), immobiles, asporulée. Elles sont anaérobies facultatives mais aérotolérantes. Elles ne produisent pas de catalase mais certaines souches possèdent une pseudo-catalase. Elles sont nitrate réductase, et cytochrome oxydase négative. Elles colonisent des milieux naturels variés tels que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau). Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Hogg, 2005; Badis et al ; 2005**) cité par **Mofradj (2014)**.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la fermentation de différents aliments. Leur capacité à produire des acides organiques responsables de l'abaissement du pH leur permet d'inhiber la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacetyl synthétisés par les bactéries lactiques peuvent aussi contribuer à la conservation des produits alimentaires par l'inhibition de la croissance de la flore indésirable. De plus ces dernières peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines (**Siboukeur, 2011; Souid,2011**) cite par **Mofradj (2014)**.

En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les vitamines (vitamines du groupe B), les sels, les acides gras et les glucides fermentes cibles (**De Roissart, 1986; Leveau et al ., 1991**) cité par **Amrouche (2003)**.

D'après (**Bourgeois et Leveau, 1991**), La principale fonction métabolique d'une bactérie lactique est d'excréter l'acide lactique ; ce qui est une notion à la fois imprécise et trop peu spécifique. Cette notion peut être affinée en désignant le substrat glucidique à partir duquel est faite cette excrétion (lactose, glucose...) ou en évaluant la quantité d'acide lactique produite par rapport à la quantité de substrat dégradé.

Ces bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. L'acide lactique est parfois le seul produit Terminal (homofermentaire). Parfois à l'acide lactique s'ajoutent de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ (hétérofermentaire) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, peuvent produire soit de:

- ❖ L'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), (Fig.18)
- ❖ L'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),
- ❖ L'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (**Vandamm et al., 1996**) cité par **Mofradj (2014)**.(Fig.18)

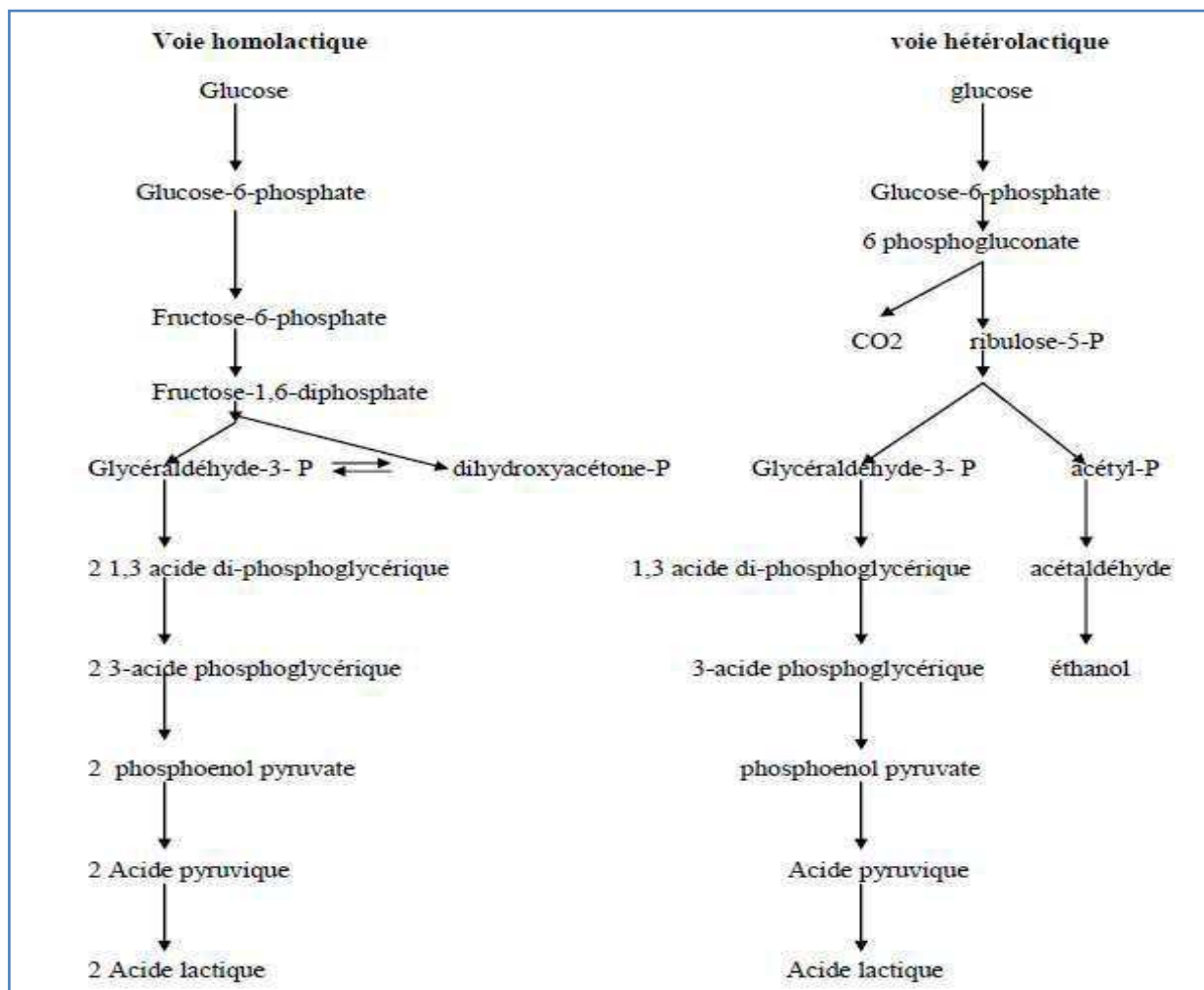


Figure 18: Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (**De Roissart et Luquet, 1994**)
cité par **Mofradj (2014)**.

La température optimale de croissance de ces souches bactériennes diffère selon les espèces, elle varie entre 28 et 45°C (**Larpen, 2000**) cité par **Metlef (2008)**.

La classification la plus récente des bactéries lactiques suggère la subdivision de groupe lactique en plusieurs genres : Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Aerococcus, Lactobacillus et Carnobacterium(**Axelsson, 1998; Leisner et al.,2000**) cité par **Mechai (2009)**.

La différentiation entre ces genres est basée sur des critères physiologiques, biochimiques et morphologiques regroupés dans le tableau II.

La classification des bactéries lactiques a été le souci de plusieurs chercheurs qui le sont finalement classés, en se basant sur les techniques moléculaires, comme le montre le tableau N°II.

Tableau II : Classification des bactéries lactiques

différents genres	Streptococcus	Leuconostoc	Pediococcus	Lactobacillus
Domaine	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Phylum	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes
Classe	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Ordre	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale
Famille	Streptococcaceae	Leuconostocaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae
Genre	Streptococcus	Leuconostoc	Pediococcus	Lactobacillus

Source : Novel (1993) cité par Metlef (2008)

Les bactéries du genre Bifidobacterium ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres Bifidobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc et Streptococcus sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers (**Champagne, 1998 ; Langella et al ., 2001**) cité par **Metlef (2008)**.

2. Utilisations industrielles des bactéries lactiques

Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau III). Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996) cité par Mechai (2009).

Tableau III: Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (McKay et Baldwin, 1990) cité par Metlef (2008).

Applications	Espèces utilisées
Fermentations des végétaux	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lb. delbruekii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de Soja	<i>Lb. delbruekii</i> , <i>P. soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lb. plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i>
Pain au levain	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Biscuits	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. leichmannii</i> , <i>Lb. casei</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp <i>latis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>Ln. lactis</i> , <i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i>

3. Les lactocoques

3.1. Généralité sur les lactocoques

Les lactocoques sont des bactéries lactiques mésophiles appartenant à la famille des Streptococaceae. Ils se trouvent principalement dans les laits et crèmes fermentées ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante (**Alais, 1984**) cité par **Tabti (2008)**.

Lactococcus est un genre de bactéries à gram positif, en forme de coques, non sporulantes. La température optimale de la croissance est de 30°C; il existe cependant des espèces qui peuvent croître à 10° C, mais pas à 45°C (**Wilson et al, 2008**) cité par **Mari (2011)**.

Le groupe des Lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. Cependant pour l'espèce *Lactococcus lactis* trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (**Axelsson, 1998**) cité par **Mechai (2009)**.

3.2. Principaux caractères:

Selon **Desmazeaud, (1996)** cité par **Metlef (2008)**, les lactocoques se présentent sous forme de coques de 1µm de diamètre, ces coques peuvent être isolées, associées par paires ou en chaînettes de longueur variable.

Ce sont des germes anaérobies facultatifs, généralement micro-aérophiles et très exigeants au point de vue nutritionnel. La plupart des espèces ne sont pas en général capsulées. Leur fermentation est homolactiques et donne de l'acide lactique surtout dextrogyre (**Guiraud, 1998**).

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires produisent exclusivement de l'acide lactique L (+). Seule *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyle. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**) cité par **Houbad (2015)**.

Elles sont mésophiles, leur température de croissance optimale est comprise entre 20 et 30 °C, peuvent croître à 10°C mais pas à 45 °C, elles ont une faible thermorésistance et ne résistent pas à un chauffage modéré tel que la pasteurisation basse .Ces microorganismes sont dépourvus de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (micro aérophiles) **(Novel, 1993 et Deroissart, 1994) cité par Metlef (2008)**

Les espèces du genre lactocoques se distinguent par leur thermo- sensibilité et leur inaptitude à croître en présence de 6.5% de NaCl et à pH=9.6 **(Schleifer et al., 1985) cité par Houbad (2015).**

Certaines espèces sont abondamment utilisées dans les industries de fermentation lactique (laiterie, beurrerie, fromagerie mais aussi saumure et salaisons).ce sont les agents d'acidification et de coagulation lactiques en fromagerie **(Guiraud, 1998).**

Le tableau IV représente les caractéristiques des ferments lactiques (Lactococcus et Streptococcus).

Tableau IV : Caractéristiques des ferments lactiques (Lactococcus et Streptococcus)

	1	2	3	4
ADH	+	-	+	-
CO2	-	-	+	-
			(citrate)	
Acétoine	-	-	+	-
			(citrate)	
Culture à 10°C	+	+	+	-
Culture à 37°C	+	+	+	+
Culture à 40°C	+	-	+	+
Culture à 45°C	-	-	-	+
Croissance à pH9.2	+	-	+	+
Résistance 30min 63°C	-	-	-	+
Culture 4% Nacl	+	-	+	-
Acide à partir de :				
Arabinose	-	-	-	+/-
Dextrine	-	-	+	.
Galactose	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+
Maltose	+	-	+	-
Raffinose	-	-	-	-/+
Saccharose	-	-	-	+/-
Tréhalose	+	-	+	-

Source :(Bourgeois et Larpent, 1996)

1= Lc lactis subsp lactis ; 2= Lc lactis subsp. Cremoris ; 3= Lc lactis subsp lactis biovar diacetylactis ; Sc.thermophilus.

3.3.Habitat des lactocoques

Les lactocoques se trouvent en grande quantité dans le lait cru et une large gamme de produits laitiers tels que le beurre et les laits fermentés, et de nombreuses variétés de fromages (soit parce qu'ils y ont été ajoutés comme levains, soit parce que les Produits laitiers ont été fabriqués à partir de lait cru à des températures favorables au Développement des lactocoques).

Les végétaux sont le réservoir naturel des lactocoques laitiers. Ces derniers sont utilisés depuis longtemps dans les levains ont perdu certains phénotypes et acquis d'autres phénotypes suite à la domestication de lactocoques issus de végétaux (**Bachmann et al ., 2012**) cité par **Houbad (2015)**.

3.4. Caractères biochimiques et nutritionnels des lactocoques

3.4.1. Besoins nutritionnels

D'après **Konning (1994)** cité par **Benguettane (2015)**, Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes.

Les lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique ce qui explique leur polyauxotrophie pour plusieurs molécules intermédiaires. Elles requièrent non seulement des substances complexes carbonées, azotées, phosphatées et soufrées mais aussi de très nombreux facteurs de croissance sont nécessaires à leur multiplication en particulier des acides aminés et des vitamines du groupe B. C'est la raison pour laquelle leur abondance dans un milieu aussi riche que le lait.

Les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés et doivent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme. Les acides aminés peuvent être apportés dans le milieu sous forme chimique pure ou alors sous forme de produits d'hydrolyse de la caséine. Ces besoins nutritionnels particulièrement spécifiques expliquent les nombreux phénomènes d'associations constatés chez les bactéries lactiques. Ils expliquent également l'amélioration de leur développement sur lait à la suite de certains traitements technologiques comme la maturation ou le chauffage (**Konnings, 1996**) cité par **Benguettane (2015)**.

Le tableau V résume les besoins nutritionnels des lactocoques

Tableau V : Besoins nutritionnels des lactocoques

Substances de croissance	Lc. lactis subsp.lactis	Lc. Lactis subsp.cremoris	Lc. lactis subsp.lactis biovar diacetylactis
Acides aminés			
Lysine	-	-	-
Leucine	□	□	□
Histidine	□	□□	□□
Valine	□	□□	□□
Cystéine	S	□□	□S
Aspartate	nd	nd	nd
Glutamate	□	□	□
Isoleucine	□	□□	□□
Tyrosine	nd	nd	nd
Méthionine	□	□	□
Vitamines			
Vit. B12	□	□	□
Biotine	□	□	□
Niacine	□	□	□
Panthothécate	□	□	□
Riboflavine	□	□	□
Thiamine	□	□	□
Pyridaxol	□	□	□
Acide folique	□	□	□
Acides organiques			
Acide acétique	□	□	□□
Acide oléique	□	□□	□□
Acide orotique	nd	nd	nd
Acide formique	nd	nd	nd
Acides nucléiques			
Hypo xanthine	S	-	-
Adénine	S	S	-
Guanine	S	-	-
Thymine	S	-	-
Thymidine	S	-	-
Uracile	S	-	-

Source : Konning, 1994) cité par Tabti (2008).

Symboles : □□: Essentiel à la croissance, - : Non requise pour la croissance, S : Stimulant, nd : Non déterminé.

3.5. Activité antimicrobienne des lactocoques

Les bactéries lactiques généralement et les lactocoques spécialement sont connus par leur capacité de produire un grand nombre d'agents inhibiteurs (les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines) contre la flore de dégradation des aliments et les bactéries pathogènes.

3.5.1. Action des acides organiques

Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est plus souvent entre **4** et **4,5** dans le cas des yaourts, **4,8** à **5,3** dans le cas des saucissons, c'est dire des valeurs inférieures aux valeurs limites de développement de la plupart des flores d'altération et de la flore pathogène (**Sutra et al., 1998**).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement du pH interne et une inhibition de la flore acido - sensible telle que les *Pseudomonas* et un blocage de certains mécanismes de transport (**Van Den Berg et al., 1995**) cité par **Metlef (2008)**

3.5.2. Action de diacétyl

Le diacétyl produit par de nombreuses bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram négatives sont plus sensibles au diacétyl que les Gram positives, les premières sont inhibées à la concentration de 200 g/l et les dernières au 300 g/l (**Hugenholtz et Starrenburg, 1992**).

3.5.3. Action des bactériocines

3.5.3.1. Définition

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne et qui peut être produite aussi bien par des bactéries à gram positif que par des bactéries à gram négatif.

Elle est considéré comme étant un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit incluant les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactéries productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (Aymerich et al., 2000 ; Ammor et al., 2006).

La nature protéique de cette substance a été identifiée par Hirsch en 1951 qui l'appela nisine ; « n » : désigne les streptocoques de groupe N selon la classification de Lancefield (1993), « is » : est l'abréviation de inhibitory substances et « ine » désigne une bactériocine (De Vuyst et Vandamme, 1993) cité par Metlef (2008).

Le spectre d'action des bactériocines se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactériostatique ou bactéricide du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactéries productrice (Tagg et al., 1976). Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

3.5.3.2. Classement des bactériocines

Bradley (1967) a classé les bactériocines selon leur poids en deux groupes :

- Bactériocines de faible poids moléculaire : non sédimentables, résistantes à la trypsine et thermostables.
- Bactériocines de haut poids moléculaire : sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visibles au microscope électronique et ressemblent aux queues de phages.

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes (Klaenhammer, 1993), cependant aucune bactériocine de *L. lactis* n'appartient aux classes III et IV.

➤ **Classe I** : « les lantibiotiques » : qui sont de petits peptides hydrophobes (< 5KDA) comprenant les acides aminés inhabituelles suivant : la lanthionine– la β méthyllanthionine et des résidus déshydraté (la dehydroalanine et déhydrobutyrine) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (staphylocoques, *Bacillus*, *Lactococcus* ...) (Cleveland et al., 2001), dans le cas des bactéries lactique l'exemple type est la nisine produite par *Lactococcus lactis* qui a une action bactéricide contre de nombreuses bactéries à gram positif mais n'agit pas sur les bactéries à gram négatif.

➤ **Classe II** : « bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés »: comporte des bactériocines constituées de peptides de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 15 KDA et thermostable (entre 30 min à 100°C et 15 min à 121°C), à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, parmi les bactériocines les plus étudiées dans cette classe la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F, (**Davay et Richardson, 1981**).

➤ **Classe III** : est représentée par des bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30 KDA), sensibles à la chaleur.

➤ **Classe IV** : comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide), cette classe a été ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (**Jiménez –Diaz et al., 1993**) mais son existence reste controversée (**Nes et al.,1996**).

3.5.3.3. Caractéristiques des bactériocines

* **Caractères biochimiques** : vue leur nature protéinique, ces substances présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques quelle que soit leur origine : pancréatique (α chymotrypsine, trypsine) ou gastrique (pepsine) (**Piard et Desmazeaud, 1992**).

* **Caractères physiques** : en général les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé (sensibles aux traitements thermiques) (**Alves et al., 2006 ; Albano et al., 2007**).

***Caractères chimiques** : Ces molécules sont stables dans les milieux acides et neutres, par contre elles perdent leur activité en milieu basique, c'est le cas de la nisine qui est inactivée à 80% à pH 10 (**Belliard et al., 1996**). De même, la lactastrepsine qui est stable à pH 4,6 – 5 et devient réversiblement inactivée à pH égal ou supérieur à 6 (**Piard et Desmazeaud, 1992 ; Kostinek et al., 2007**), cependant **Lee et Paik, (2001)** rapportent que l'activité de la bactériocine, issue d'un streptocoque lactique mésophile, n'est pas affectée par une variation du pH allant de 2 à 11.

***Caractères antigéniques** : certaines bactériocines peuvent présenter des propriétés antigéniques qui sont en rapport avec leur poids moléculaire élevé et le niveau de complexité structurale (**Metlef, 2008**).

***Caractères génétiques** : la synthèse des bactériocines par les lactocoques est régie par des facteurs dits « facteurs bactériocinogènes » qui sont portés soit par des chromosomes, soit par des éléments extra chromosomiques tels que les plasmides (**Barrefoot et Klaenhammer, 1984 ; Larpent, 2000**).

En parallèle à la production de bactériocine, les bactéries synthétisent une protéine dite « d'immunité » qui leur permet de contrôler l'action du composé antagoniste l'exemple est celui des gènes NISI et nis FEG qui sont impliqués dans l'immunité cellulaire à la nisine.

En général, les facteurs bactériocinogènes et les protéines d'immunité sont portés par le même gène et la transmission des facteurs bactériocinogènes se fait soit normalement par voie héréditaire ou par transduction ou alors après une manipulation génétique.

En effet, grâce au génie génétique, des souches capables de produire des taux élevés de bactériocines ou de ferments résistants aux inhibiteurs ont été produites (**Ray et al., 1992 ; Leloir et al., 2001**).

3.5.3.4. Mode d'action des bactériocines

Selon **Tagg et al. (1976)** le mode d'action des bactériocines comporte deux étapes :

1^{ère} étape : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

2^{ème} étape : elle est une phase irréversible implique la modification pathologique de la cellule cible. **Chung et al. (2000)** ont confirmé que l'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et la perte des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle dans le maintien de l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse macromoléculaire (ADN, ARN, protéines).

Alors que **Schved et al. (1994)** assurent que les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- **Effet bactériostatique** : c'est-à-dire ralentissement ou arrêt de la croissance
- **Effet bactéricide** : perte de la viabilité et lyse cellulaire telles que la nisine
- **Effet bactéricide** sans lyse cellulaire

3.5.3.5. Utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire

L'application des bactériocines constitue une nouvelle perspective pour la conservation des aliments et l'élimination des microorganismes indésirables et pathogènes.

La nisine produite par des souches de *Lactococcus lactis*, fut la première bactériocine utilisée comme bioconservateur alimentaire, elle est reconnue comme GRAS (Generally Recognised As Safe) par l'organisation mondiale de la santé et son utilisation est autorisée dans plus de 48 pays.

Dans les produits laitiers, les travaux de **Thuault et Quimper, (1997)** montrent que l'utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines dans la fabrication du fromage à pâte molle diminue d'un facteur de 10% le taux de *Listeria monocytogènes*.

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation de la nisine (2000 µl/g) dans le fromage blanc au bout de trois jours d'incubation à 20°C.

Dans les produits carnés, **Richard, (1996)** ; **Kalta et al. (2001)** ont montré qu'une destruction de 99,9% de la population initiale de *Listeria monocytogènes* a été enregistrée lors de l'utilisation de 5000 µl/g de nisine dans la viande fraîche hachée et conservée à 4°C.

4. Les probiotiques

4.1. Historique et définition des probiotiques

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotiques a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines (**Metchnikoff, 1907**) cité par **Mailys (2010)**.

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes (**Mechai ,2009**).

Ensuite, Parker élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (**Parker, 1974**) cité par (**Mailys ,2010**) . Plus tard, Fuller, en 1989, redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Larpen ,1997**). Par opposition aux précédentes définitions, la définition suivante introduit la notion de souche définie bien caractérisée d'un point de vue taxonomique ainsi que la notion de quantité apporté à l'homme. La FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante :

« Micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère» (**FAO/OMS, 2002**) cité par **Laffargue (2015)**

4.2. Démarches générales de sélection des probiotiques

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Être un habitant naturel de l'intestin,
- Être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...)
- Être non invasif, non carcinogène et non pathogène
- Être capable de Co-agréger pour former une flore normale équilibrée
- Survivre aux différents procédés technologiques de production
- Garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal.

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection important. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autre la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes. Ceci laisserait donc envisager une éventuelle redéfinition des probiotiques où la notion de viabilité sera à reconsidérer (Mechai, 2009).

Selon le rapport de la FAO/WHO (2002) cité par Metlef (2008), pour qu'une espèce bactérienne soit reconnue comme étant probiotique, il faut désigner le genre, l'espèce et la souche car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques.

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures. Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des Bifidobacterium (Tableau VI).

Tableau VI: Microorganismes employés comme probiotiques chez l'homme et chez les animaux d'élevage.

Lactobacillus	Bifidobacterium (Bf)	Bactéries lactiques ou pseudo lactiques	Bactéries non lactiques et moisissures
Lb. bulgaricus	B. adolescentis	Enterococcus faecalis	Bacillus cereus
Lb. brevis	B. animalis	Streptococcus thermophilus	Bacillus subtilis
Lb. acidophilus	B. bifidum	Enterococcus faecium	Escherichia coli
Lb. casei	B. breve	Lactococcus lactis	Saccharomyces cerevisiae
Lb. cellobisus	B. infantis	Leuconostoc mesenteroides	Aspergillus niger
Lb. crispatus	B. lactis	Pediococcus acidilactici	Aspergillus oryzae
Lb. fermentum	B. longum	Propionibacterium freudenreichii	
Lb. gallinarum	B. thermophilus		
Lb. gasseri			
Lb. johnsonii			
Lb. lactis			
Lb. paracasei			
Lb. plantarum			
Lb. reuteri			

Source : Dacosta, (2001) cité par Metlef (2008)

4.3. Effets des probiotiques sur la santé humaine

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le tableau VII.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau VII : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007)

Evidences scientifiques fortes	
Effets des Probiotiques	Mécanismes des Probiotiques
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action de la β- galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse ▪ Stimulation du système immunitaire ▪ Dégradation des protéines allergènes
Evidences scientifiques prometteuses	
Effets des Probiotiques	Mécanismes des Probiotiques
Activité hypocholestérolémiant	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Assimilation du cholestérol ▪ Déconjugaison des sels biliaires
prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Production de composés antimutagéniques ▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ▪ Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritable des intestins	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène
Effet antihypertenseur	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

4.4. Evaluation du risque sanitaire des probiotiques sur l'homme

Il a longtemps été considéré que ces bactéries bienfaitantes étaient sans danger pour l'Homme. Cependant, depuis 2001, on connaît aux probiotiques, quatre effets secondaires (**Marteau, 2001.**, **Marteau et Shanahan; 2003**) cite par (**Mechai, 2009**):

- La survenue d'une infection systémique.
- Une stimulation anormale, excessive, du système immunitaire chez les personnes à risque.
- Un possible transfert de gènes.
- La survenue d'activités métaboliques délétères.

Dédicace

Grace à Allah ...

Je dédie ce modeste travail à :

*mes très chers parents : Hocine et Rebiha pour l'affection et l'amour qui m'ont
donné le courage et la force dans les moments les plus difficiles.*

mes chères sœurs : Nouara, Samira, Zahira et Halima .

Ma chère sœur Samiha et son mari Zoubir et son fils Iyed(Doudou)

mes chers frères: AMour et Djalel.

Toutes mes amies, surtout : Fadila, Rabiaa, Merieme, Souad et particulièrement,

ma binôme Kasmi Narimane.

tous ceux qui m'ont aidé dans mes études

tous mes proches, mes amis et tous ceux qui m'aiment.

Nassira



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers et respectueux parents vraiment aucune dédicace ne serait exprimer mon attachement et mon affection, je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me combler.

A mes grand- mère surtout ma grand- mère FATIMA qui nous à quitter voilà 3ans.

A mon frère ATMANE.

A mes sœurs qui mon soutenue moralement : ISMAHANE, ASSMA, RYMA.

A mes oncles : LAKHDAR et sa femme SALMA, et leurs enfants : WAFI, LYAS, MOUHA, HILALE, mon oncle MALEK et sa femme NADIA et à mon oncle RAZKI.

A ma tante Fatiha et son fils Aissa.

A la personne qui m'ont encouragé et aidée : MNOUCHE.

A tous mes amies : HADJER, IBTISSAME, MARIEM, FARIZA.

A tous les étudiants de ma promotion.

NARMANE



2- Discussion

2.1. Dénombrement des bactéries :

En vue de détecter la présence des probiotiques dans la propolis Algérienne, un total de 7 échantillons de la propolis a été collecté puis analysé.

D'après les résultats obtenus après analyse de 7 échantillons, de provenances différentes et de dates de récolte différentes aussi, nous avons confirmé la présence de bactéries probiotiques (lactocoques) dans la propolis.

Comparativement aux résultats obtenus par **Boukharouba N et Kirouani H(2015)** qui ont confirmé la présence des lactocoques dans la propolis avec des nombres comparables à ceux obtenus dans notre travail.

Concernant l'origine de ces bactéries probiotiques des chercheurs Suédois de l'Université de Lund ont identifiés un groupe unique de 13 espèces de bactéries lactiques présentes dans le jabot des abeilles, dans le miel frais et dans le pain d'abeille frais.

Dans notre travail nous n'avons pas pu déterminer l'origine des probiotiques que nous avons dénombré dans nos échantillons.

Après l'interprétation de nos résultats, nous avons soulevés des remarques importantes :

✓ Une grande variation entre le nombre d'UFC trouvé dans les différents échantillons analysés, surtout entre les échantillons prélevés au moment de l'analyse et les autres qui sont prélevés et entreposés pendant une longue durée avant l'analyse. C'est-à-dire que le nombre des lactocoques présent dans la propolis diminue avec le temps. Aussi les échantillons de la propolis commercialisée contiennent une quantité de probiotique importante et comparable à celle trouvée dans la propolis fraîche.

✓ Concernant les E4 (Ain Lahdjer-Sétif) et E6 (Djaafra-BBA) donnent les mêmes résultats, c'est à dire un nombre élevé des lactocoques malgré que la provenance est différente mais les deux échantillons sont analysés juste après la récolte ce qui signifie que la quantité de probiotiques (lactocoque) est plus importante lorsque la propolis est fraîche.

- ✓ Les résultats obtenus pour E2 (Alger1) et E3 (Alger2) sont comparables et donnent un nombre considérable de lactocoque, sachant que les deux échantillons sont commercialisés et purifiés avec des méthodes peuvent être différentes à celles utilisés pour les autres échantillons, ce qui déduit que la méthode de purification peut jouer un rôle dans la charge microbienne (lactocoque) de la propolis.
- ✓ La comparaison du nombre de lactocoque trouvé pour E1(Sidi Brahim-BBA) et E7(Bouira) qui est trop élevé dans E7 et modéré dans E1,sachant que les deux échantillons sont prélevé dans la même période (décembre 2016), ce qui indique qu'il y a un autre facteur qui influe sur la quantité de probiotique trouvée dans la propolis, dans ce cas nous avons pensé que l'origine géographique est la cause de cette différence.
- ✓ Concernant le nombre de lactocoque trouvé dans E5(Eulma-sétif) qui est très peu par rapport au nombre trouvé dans l'échantillon E4 (Ain Lahjer-Sétif) prélevé de la même région mais dans des périodes différentes, la même chose pour E1(Sidi brahim –BBA) et E6 (Djaafra-BBA),l'explication que nous pouvons donner est que la quantité de probiotique est diminuée avec le temps dès le premier jour de récolte.
- ✓ La comparaison des résultats obtenus pour tous les échantillons montre que la quantité de probiotique (lactocoque) trouvée est considérable sauf l'E5 qui donne un nombre très réduit par rapport aux autres et par rapport à E4 qui est de la même prévenance ce qui indique que la race d'abeille peut être la cause de cette différence.

En conclusion, nous pouvons dire que la propolis est très riche en probiotique (lactocoque) et cette richesse est sous l'influence de plusieurs facteurs tels que : l'origine géographique, l'état de la propolis (fraîche ou non), les conditions climatiques, la race de l'abeille et la faune botanique existe dans la région.

2.2. L'aspect macroscopique et microscopique des colonies :

L'examen macroscopique des colonies sur milieu gélosé M17 révèle que toutes les colonies présentent un aspect lisse, de couleur blanchâtre à contour régulier.

Après la coloration de Gram et l'observation au microscope qui montre que ce sont des bactéries Gram (+) et elles se présentent sous forme de coques groupées en paires ou en chaînettes et elles sont immobiles.

D'après ces résultats, nous avons confirmé que les bactéries isolées ont les mêmes caractères que ceux des lactocoques et ça selon **Desmazeaud, (1996)** cité par **METLEF (2008)** qui montre que les lactocoques se présentent sous forme de coques de 1µm de diamètre, ces coques peuvent être isolées, associées par paires ou en chaînettes de longueur variable.

2.3. L'identification biochimique des bactéries :

Dans notre expérimentation, nous avons étudié les caractères biochimiques des souches isolées à partir de la propolis et nous avons obtenu les résultats suivant :

- toutes les souches isolées sont immobiles
- toutes les souches isolées se distinguent par leur thermo- sensibilité et leur aptitude à croître en présence de 4.5% et leur inaptitude à croître en présence de 6.5% de NaCl et à pH=9.6 (**Schleifer et al., 1985**) cité par **Houbad (2015)**.
- toutes les souches isolées peuvent croître à 10° C, mais pas à 45°C ni à 50°C (**Wilson et al, 2008**) cité par **Mari (2011)**.
- toutes les souches isolées sont homolactiques (**Guiraud, 1998**).
- Ces microorganismes sont dépourvus de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (microaérophiles) (**Novel, 1993 et Deroissart, 1994**) cité par **Metlef (2008)**

Pour le test de la fermentation des sucres, toutes les souches isolées sont capables de fermenter les sucres (Glucose, Saccharose, Lactose), cette fermentation est révélé par le virage de la couleur après l'incubation des tubes mais elle était avec différent degré et ça surtout pour :

- **La fermentation du Glucose** : chez S1 est moins importante (+) par rapport aux autres souches.
- **La fermentation du Saccharose** : elle est importante (+++) chez S6 et S7 et modérée (++) chez S3 et moins importante (+) chez S1, S2, S4 et S5.
- **La fermentation du Lactose** : elle est importante (+++) chez S1, S2, S3, S5, S6 et S7 et modérée (++) chez S5.

Les tests biochimiques constituent une approche classique, incontournable pour l'identification des bactéries et la détermination de certaines espèces, ainsi que de connaître

certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées (**Goszczyńska et al.,2000**) cité par **Kahia(2015)**.

A la lumière des résultats de tous les tests réalisés, nous avons constaté que les souches obtenus sont *Lactococcus* sp. Mais malheureusement, nous ne pouvons pas identifier l'espèce, nous avons identifié seulement le genre à cause non réalisation des autres tests tel que ADH (Arginine dihydrolase), production d'acétoïne et la galerie API50CHL spécifiquement pour l'identification les bactéries lactiques et ça est le résultat du manque des moyens au niveau du laboratoire d'analyse, lieu de réalisation de ce travail.

2.4. Mise en évidence des effets inhibiteurs des *Lactococcus* sp contre les Gram⁻ pathogènes (*E. Coli*) :

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet antagoniste des 7 souches isolées à l'égard d'une espèce pathogène (***E. Coli***)

Les souches de lactocoques ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis les espèces intestinales ; elles montrent des variations plus ou moins importantes qui dépendent de la souche elle-même (lactocoque).

L'évaluation de l'activité antagoniste des lactocoques vis-à vis (***E. Coli***) a été faite par la méthode des disques qui reste l'outil analytique le plus adapté pour étudier l'interaction entre deux espèces bactériennes, l'une est appelée indicatrice et l'autre cible (**Daoudi et Fliss, 2000 ; Lachance,2000**) cité par **Metlef (2008)**.

D'après les résultats obtenus, il en ressort que les souches de ***Lactococcus* sp** sont à l'origine de zones d'inhibition importantes contre ***E. Coli***. Sachant que le diamètre des zones d'inhibitions est compris entre 2cm (plus faible activité observée pour les souches 02 et 07) et 2,7 cm (plus grande activité observée pour la souche 05). Donc toutes les souches isolées ont un effet inhibiteur remarquable contre ***E. Coli*** et avec un spectre d'action comparable ce qui aboutit à penser que les souches isolées peuvent être appartient à des espèces proches ou peuvent être de la même espèce.

L'activité inhibitrice des lactocoques vis-à-vis des espèces de la flore intestinale est provoquée soit par les cellules elles même, soit par des substances extracellulaires produites par les souches. Les lactocoques sont capables de produire deux substances majeures (acide

lactique et bactériocines) responsables de l'effet antagoniste vis-à-vis des espèces intestinales **(Labioui, 2005)**.

Les résultats que nous avons trouvés peuvent être expliqués par l'effet des bactériocine et l'acide lactique produits par ces souches.

Introduction

La santé et la beauté font parties des préoccupations de l'homme qui continue toujours de chercher le meilleur moyen de les entretenir. Ses recherches ont connu un changement considérable ces dernières années. Plusieurs industriels tels que les firmes pharmaceutiques et l'industrie du cosmétique ont suivi une nouvelle révolution : le retour à la nature. Ainsi, la médecine douce propose des traitements moins agressifs et surtout plus acceptés par le malade et la cosmétologie propose des préparations à base de produits naturels plus appréciées et plus recherchées par le consommateur **(Ghisalberti 1979)**.

L'Apitherapie est l'une des méthodes de soin naturelle. Elle est basée sur les produits de la ruche tel que : le miel, la gelée royale, la propolis ...etc **(Burdock 1998)**.

Les premières traces de cette science remontent à l'Egypte antique, cette pratique est mentionnée dans de nombreux écrits. On retrouve les traces d'utilisation du miel qui fut l'ingrédient le plus utilisé dans les remèdes, tant en usage externe ou interne pour les blessures et les brûlures. Des recherches plus poussées ont permis aux égyptologues de découvrir les traces d'utilisation d'un autre produit apicole : la propolis. Cette substance était utilisée par les grands prêtres de l'ancienne Egypte pour les embaumements des momies. Les anciens grecs l'ont utilisée pour les suppurations. Les romains quant à eux, l'ont donnée à tous les soldats pour soigner les blessures pendant leurs différentes invasions. Cette substance est souvent mentionnée, à côté d'autres produits de la ruche dans les traités de Géorgie à partir du XII siècle. Avicenne l'a mentionné aussi dans son livre « Le canon de la science médicale » et décrit une utilisation thérapeutique de ce produit **(Burdock 1998)**.

La propolis est donc utilisée en médecine populaire depuis les temps les plus reculés. Son utilisation sans avoir été permanente s'est poursuivie au fil des années jusqu'à ce qu'elle soit redécouverte de façon relativement récente. Ces dernières années de nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et aux effets biologiques de cette substance. Ces travaux ont montré que cette substance est composée essentiellement de flavonoïdes. Cette composition varie en fonction de son origine, de l'espèce d'abeille et du temps de la récolte. On lui reconnaît de nombreuses propriétés : antibactérienne **(Ghisalberti 1979)**, antivirale, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse ... etc **(Burdock 1998)**.

En outre la propolis riche en probiotiques qui sont des suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants parmi lesquelles les bactéries lactiques (Lactocoques) qui influent de façon favorable sur la flore intestinale en améliorant leur équilibre (**Ghisalberti 1979**).

L'ensemble de ces données nous a encouragés à étudier la microflore qui peut contenue la propolis notamment les bactéries lactiques, ainsi que l'identification biochimique des souches éventuellement présentent, et la mise en évidence de l'effet inhibiteur sur les souches pathogènes, dans un but de valoriser cette substance et d'expliquer leur utilisation comme un traitement anti fongique.

Notre travail est constitué de 2 parties, une partie théorique contenant une recherche bibliographique sur l'abeille et la ruche, afin de comprendre l'animal et l'organisation de la colonie et ses précieux produits, puis nous étudierons la propolis, sa découverte, les méthodes de récolte, sa composition et leurs propriétés thérapeutiques, par la suite nous étudierons les probiotiques, en particulier les Lactocoques.

La partie expérimentale de notre étude est basé sur : La recherche et le dénombrement des bactéries lactiques présente dans la propolis, par la suite une série de tests biochimiques et physiologique sont réalisées pour les souches isolées à partir de la propolis, vers la fin une mise en évidence d'une interaction entre ces bactéries et des bactéries pathogènes (E. coli) pour prouver le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques.

*Annexe 01: les différentes compositions de la propolis
(Bankova, 2005 ; Anonyme, 2013 b).*

<p align="center">ACIDES PHÉNOLIQUES</p>	<p>Acide benzoïque Acide 4-hydroxy- benzoïque Acide protocotéchuïque Alcool benzoïque Acide 2-phénylique-2-hydroxy-acrylique 2-Méthoxy-4-vinylphénol 2-propène 3-méthylbutyl férulate Pentényle férulate Diméthylallyle férulate Pentényle p-coumarate Acide p-coumarique-prényle</p>	<p>Acide propénoïque 5-bis (3-méthyle-2-butényle -phényle-2(E) Acide dihydrocimanique Acide 3, 4-diméthoxy-cinnamique Ester glycéryl d'acide cinnamique Acide -4-méthoxy-cinnamique 3-hydroxy-4-méthoxy-cinnamique acide Acide férulique Acide isoférulique Acide trans-p-coumarique Acide cis-p-coumarique Indole carboxylique-2-acide</p>
<p align="center">FLAVONOÏDES (FLAVONOLS)</p>	<p>Kaempféride, kaempférol 8-méthylkaempférol</p>	<p>3-méthylgalangine, 7-méthylgalangine, isorhamnetine, fisétine, Bétutérol, galangine, rutine</p>

<p align="center">Flavonoïdes (Dihydroflavonols, flavonols ou Flavononols)</p>	<p>Pinobanksine Acétate de 3-O-pinobanksine Butanoate de pinobanksine Ether de méthyle 7-pinobanksine Pinobanksine 3-étanoate</p>	<p>2-phényle éthyle eicosanoate 2-phényle éthyle docosanoate 2-phényle éthyle tetracosanoate 2-phényle éthyle hexacosanoate 3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavonol pinobanksine 3-pentanoate</p>
<p align="center">Flavonoïdes (flavonones)</p>	<p>Hespéritine Pinostrobin 2,6-dihydroxy-4-méthoxychalcane (chalcane pinostrobin) Flavanone trihydroxyméthoxy</p>	
<p align="center">Flavonoïdes (flavonones)</p>	<p>Izalpine Pinocembrine chalcane de pinocembrine naringine Sakuranétine Isokuranétine 2-méthylebutyroulpinobanksine</p>	

<p>Flavonoïdes (flavones)</p>	<p>Sidéritiflavone Acacétine chrysin Tectochrysin Lutéoline 3, 5,7-trihydroxy-6,4'-diméthoxyflavone 5, 7,4'-trihydroxy-6,8-diméthoxyflavone 5,7- dihydroxy flavone Dihydroxyméthoxyflavone Prénylflavone cytotoxique</p>	<p>Baicaléine Ermanine Apigénine 5, 6,7-trihydroxy-3,4'-dihyméthylallyle cafféate 4'-méthoxy-bavachromonal Isosalivane isoflavane Médicarpine Aromadendrine-4'-etherméthyle</p>
--	---	--

Annexe 02 : Les effets antimicrobiens de la propolis (Bankova et al., 2002).

La Bactérie	Commentaire
Bacillus larvae	Détruite
B.subtilis	Détruite
Helicobacter pylori	Inhibé
Staphylococcus sp	Inhibé
Staphylococcus aureus	Effet synergique
Streptococcus sp	Inhibé
Streptomyces	Inhibé
S.sobrinus, mutans, cricetus	Caries dentaires
Saccharomyces cerevisiae	Destruction
Escherichia coli	Inhibé
Salmonella	Potentiel. Éliminé
Giardia lambia	Effet positif
Bacteroides nodosus	Réduite
Klebsiella pneumoniae	Effet positif

Annexe 03 : Les effets antiviraux et antifongiques (Bankova et al., 2002).

LEVURES

Candida albicans	Effets synergiques
Aspergillus niger	Effets positif
Botrytis Cinerea	In vitro fongicide
Ascospoera	Inhibé

VIRUS

Herpès	Inhibé in vitro
Virus de pomme de terre	Effectif
Influenza (grippe A et B)	Réduite de 72%
Maladie de Newcastle	Virus de reproduction affecté

Annexe 04 : Les effets de la propolis contre les bactéries pathogènes, et les virus (Bankova et al., 2002).

Bactéries Gram +

Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Corynebacterium spp, Corynebacterium, Diphtheria, Diplococcus Pneumoniae, Entérocoques spp, Mycobacteria sp, Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Streptococcus : critecus, epidermis, faecalis, mutans, pyogenes, viridans, sobrinus.

Bactéries Gram -

Branhamella catarrhalis, E. coli, Helicobacter pylori, Klebsiella azaemae, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella : chloeraesuis, dublin, enteritidis ; shigella : dysinteriae, sonnei.

Champignons

Aspergillus sp, Candida : albicans, guiliermondi, parasitosis, tropicalis ; Cryptococcus sp, Cryptococcus neoformans, Histoplasma encapsulatum, Microsporium : audoinini, canis ; saccharomyces sp.

Virus

Adenovirus, Coronavirus, Herpes symplex, influenza A et B virus, Poliovirus, Vaccinia, Rotavirus, Vesiculas stomatits virus.

Annexe 05: Les compositions des milieux de culture.

Milieu Gélosé M17 :

Composant

Tryptone	05 g
Peptone de soja	05g
Infusion de viande	05g
Extrait de levure	2,5g
Acide ascorbique	0,5g
Sulfate de magnésium, 7H₂O	0,25g
β-glycérophosphate di sodique	19g
pH= 6,9± 0,2	

Sabouraud :

Composant

Peptone	10 g
Glucose	20g
Agar-agar	15 g
Chloramphénicol	0,5g
pH= 5,6	

Muller Hinton :

Composant

Hydrolysate acide de peptone	05g/l
Extrait de viande	03g/l
Amidon	1,5g/l
Agar bactériologique	16g/l
pH= 7,3	

Bouillon M17 :

Composant

Sodium glycérophosphate	19g
Peptone	05g
Extrait de viande	2,5g
Lactose	05g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de caséine	05g
Extrait de levure	2,5g
Acide ascorbique	0,5g
Sulfate de magnésium	0, 25g
pH= 7,2±0,2 à 25°C.	

Eau Peptonée :

Composant

Peptone exempte d'indole	10g
Chlorure de sodium	05g
pH= 7,2	

Bouillon MRS :

Composant

Dextrose	20g
Peptone bactériologique	10g
Extrait de bœuf	8g
Acétate de sodium	5g
Extrait de levure	4g
Phosphate dipotassique	2g
Citrate triammonique	2g
Tween	1g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
pH= 6,2±0,2 à 25°C	

Liste des abréviations

ADN : acide désoxy ribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BM : Bleu de Méthylène

CFU : Colony-forming units

CO₂: Dioxyde de Carbone.

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes

DL₁₀₀: Dose Létale Qui donne 100 pourcent de mortalité.

DL₅₀ : Dose Létale Qui donne 50 pourcent de mortalité.

EEP: Extrait Éthanolique de Propolis.

FAO: Food and Agricultural Organization.

GRAS : Generally Recognised As Safe

HIV: Human immunodeficiency virus (SIDA: Le syndrome d'immunodéficience acquise).

IND : Indénombrable

LAB: Lactis Acid Bacteria (Bactéries lactiques)

Lb : Lactobacillus

Lc : Lactococcus

Ln : Leuconostoc

MH : Mueller-Hinton

MRS : Man-Rogosa-S harpe

Nacl: Chloride de Sodium.

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORL: Oto- Rhino-Laryngologie.

P : Pediococcus

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction polymérase en chaîne)

pH: Potentiel D'hydrogène.

PNN : Poly Nucléaire Neutrophile

PRR : Pattern Recognition Receptor (Récepteur de reconnaissance de motif moléculaire)

S : Souche

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

St : Streptococcus

ZI : Zone d'Inhibition

Liste des figures

Figure 01 : Apis dorsata.....	06
Figure 02 : Apis mellifera.....	06
Figure 03 : Apis florea.....	06
Figure 04 : Apis cerana.....	06
Figure 05 : Reine et sa cour.....	07
Figure 06 : Naissance d'un faux bourdon.....	08
Figure 07 : Ouvrière qui butine une fleur de colza.....	09
Figure 08 : Morphologie externe de l'abeille femelle adulte.....	10
Figure 09 : Schéma de la tête d'une abeille adulte.....	11
Figure 10 : Appareil vulnérant d'un individu femelle.....	11
Figure 11 : Propolis brut.....	16
Figure 12 : Récolte de la propolis par l'abeille.....	19
Figure 13 : Butineuses de la propolis dans la ruche.....	19
Figure 14 : Récolte de la propolis sur grilles.....	20
Figure 15 : Récolte de la propolis par grattage.....	20
Figure 16 : Différentes couleurs de la propolis selon l'origine de flore naturelle.....	23
Figure 17 : La composition chimique de la propolis.....	25
Figure 18 : Dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	31
Figure 19 : La macération de la propolis	52
Figure 20 : Diagramme représentatif de la procédure de l'extraction éthanolique de la propolis (EEP).....	53
Figure 21 : Les étapes d'extraction éthanolique de propolis (EEP).....	54
Figure 22 : Test de croissance à différentes concentrations de Nacl.....	60
Figure 23 : Test de thermorésistance.....	61
Figure 24 : Précultures d' <i>E. Coli</i>	63

Figure 25 : Précultures des Lactocoques.....	63
Figure 26 : Les étapes de l'interaction entre les Lactocoques et E. Coli.....	64
Figure 27 : La conservation des isolats dans M17 inclinée.....	65
Figure 28 : Schéma de conservation à longue durée des lactocoques purifiées.....	66
Figure 29 : Aspect des colonies après repiquage sur gélose M17.....	68
Figure 30 : Croissance des souches lactiques après repiquage dans le bouillon MRS.....	69
Figure 31 : Croissance des souches lactiques après repiquage dans l'eau physiologique.....	69
Figure 32 : Aspect des colonies après ensemencement par stries sur gélose M17.....	70
Figure 33 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17.....	70
Figure 34 : La Coloration de Gram.....	71
Figure 35 : La coloration au bleu de méthylène.....	71
Figure 36 : Test de mobilité.....	72
Figure 37 : Test de croissance dans différentes concentrations de NaCl.....	72
Figure 38 : Test de croissance à 10°C.....	73
Figure 39 : Test de croissance à 46°C.....	73
Figure 40 : Test de croissance à 50°C.....	73
Figure 41 : Test de croissance dans un milieu à pH 9,6.....	74
Figure 42 : Test de fermentation des sucres (Glucose).....	75
Figure 43 : Test de fermentation des sucres (Saccharose).....	75
Figure 44 : Test de fermentation des sucres (Lactose).....	75
Figure 45 : Test de thermorésistance.....	76
Figure 46 : Test du type fermentaire.....	77
Figure 47 : L'interaction entre les bactéries lactiques (Lactococcus sp) et les bactéries pathogènes E .Coli).....	80

Liste des tableaux

Tableau I : Différentes utilisations de la propolis dans les cosmétiques.....	22
Tableau II : Classification des bactéries lactiques.....	32
Tableau III: Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes.....	33
Tableau IV : Caractéristiques des ferments lactiques (Lactococcus et Streptococcus)	36
Tableau V : Besoins nutritionnels des lactocoques.....	38
Tableau VI : Microorganismes employés comme probiotiques chez l’homme et chez les animaux d’élevage.....	45
Tableau VII : Effets positifs des probiotiques sur la santé.....	46
Tableau VIII : Présentation des différents échantillons.....	51
Tableau IX: dénombrement des lactocoques dans milieu de culture M17 (UFC/g).....	68
Tableau X: Résultats du test de croissance à différentes températures (10°C, 30°C, 46°C, 50°C).....	74
Tableau XI: La fermentation des sucres par les souches testées.....	76
Tableau XII: Les caractères physiques, phénotypiques et biochimiques des souches étudiées.....	78
Tableau XIII: Les résultats de l’interaction entre les Lactocoques sp et E. Coli (Les zones d’inhibition en millimètre).....	81

1- Matériel et méthode

1.1. L'objectif de l'étude

Cette partie représente les différents protocoles utilisés et la démarche choisie pour la réalisation de notre travail afin de répondre aux objectifs fixés. L'intégrité de ce travail a été réalisée au sein de laboratoire de Microbiologie de la faculté SNV relevant de l'université de Bordj Bou Arreridj, durant la période Février – Juin 2017.

Notre objectif est basé sur la valorisation de la propolis, cette substance qui possède une microflore avec propriétés importantes parmi lesquelles leur effet probiotique, et leur pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes.

Dans un premier temps un recherche et un dénombrement des probiotiques (bactéries lactiques) présentent dans cette dernière a été réalisé.

Dans une deuxième étape une série de tests biochimiques et physiologiques sont réalisées pour déterminer les caractères biochimiques de ces bactéries.

Enfin une mise en évidence d'une interaction entre les bactéries lactiques (*Lactococcus* sp « Gram⁺ ») et les bactéries pathogène (*E. Coli* « Gram⁻») a été réalisé pour démontrer le pouvoir inhibiteur des *Lactococcus* sp.

1.2. Echantillonnage

Deux types de la propolis ont été utilisés lors de cette étude, une propolis brute ou fraiche et une propolis commercialisée.

1.2.1. La propolis fraiche

Les échantillons de la propolis ont été fournis par des Apiculteurs de 5 régions d'Algérie (Sidi Brahim-BBA- ; Bouira ; Sétif (Ain Lehdjer, Eulma) ; Djaafra-BBA-) qui sont récoltées par grattage des cadres de la ruche, et sont conserver à Température 4°C jusqu'au moment d'analyse.

1.2.2. La propolis commercialisée

Deux échantillons de propolis commercialiser ont été collectés de :

- Alger (Beb Zouar).
- Alger (Tipaza).

Le tableau VIII indique l'origine géographique, le type de chaque échantillon de propolis et la date de prélèvement.

Tableau VIII : Présentation des différents échantillons.

Echantillon	Type	Origine géographique	La date de prélèvement
E1	Fraiche	Sidi Brahim	Mois d'Octobre
E2	Commercialiser	Alger (Beb Zouar)	Inconnue
E3	Commercialiser	Alger (Tipaza)	Inconnue
E4	Fraiche	Sétif	Mois de Janvier
E5	Fraiche	Eulma	Mois de Novembre
E6	Fraiche	Djaafra	Mois de Mars
E7	Fraiche	Bouira	Mois d'Octobre

1.3. Méthodes d'analyse

1.3.1. Les conditions du travail

Toutes les manipulations doivent être faites dans des conditions aseptiques :

- La paillasse doit être nettoyée avant et après chaque manipulation avec l'eau de javel.
- Les mains doivent être désinfectées avec l'eau de javel avant et après la manipulation.
- Les manipulations doivent être effectuées dans une zone stérile de bec bunsen.
- Le matériel utilisé doit être propres et stériles.
- Lors de la manipulation les boîtes de pétrie doivent être ouvertes à moitié avec couvercle soulevé de façon inclinée vers la flamme de bec bunsen.
- Les orifices des flacons ou les tubes à essai doivent être stérilisés dès l'ouverture et avant la fermeture en faisant passer ces orifices à la flamme de bec bunsen.

Toutes ces précautions ont été effectuées dans le but d'éviter tout sort de contamination lors de la manipulation.

1.3.2. La préparation des échantillons

Concernant les échantillons commercialisés, ils sont purifiés au préalable tandis que les échantillons frais vont subir les opérations suivantes :

✓ La purification des échantillons

La purification des échantillons est réalisée selon trois méthodes :

• La macération

La préparation des échantillons est réalisée à la température ambiante par macération, une quantité de 10g de la propolis fraîche est coupée en petits morceaux, elle est ensuite extraite dans un volume de 100ml d'éthanol (70%), l'agitation est effectuée à l'obscurité et pendant 72 heures (**Kartal et all., 2003**).

La solution de propolis est filtrée à l'aide d'un papier filtre (Whatman N° 02), puis une évaporation sous vide est réalisée au filtrat par un rotavapeur à température 45°C. Après l'évaporation, le matériel résiduel est dissout par l'ajout d'un petit volume d'éthanol (70%) cette solution est versé dans une boîte de pétri pesée préalablement (P'). Après le séchage dans l'étuve à 37°C (24 h), la boîte est pesée à nouveau (P'') et la différence entre P' et P'' donne le rendement d'extrait de propolis. Par la suite un volume de 11ml d'éthanol est ajouté à la propolis purifiée. La solution obtenue est considérée comme la solution mère(SM) qui est doit être utilisée lors de l'ensemencement (**Kartal et all., 2003**).Le rendement des échantillons est : Sidi Brahim 8,2%, Eulma 7,9%, Sétif 10,2%, Alger(1) 12,3%, Alger(2) 10,5%, Djaafra 5,6%, Bouira 7,7%.

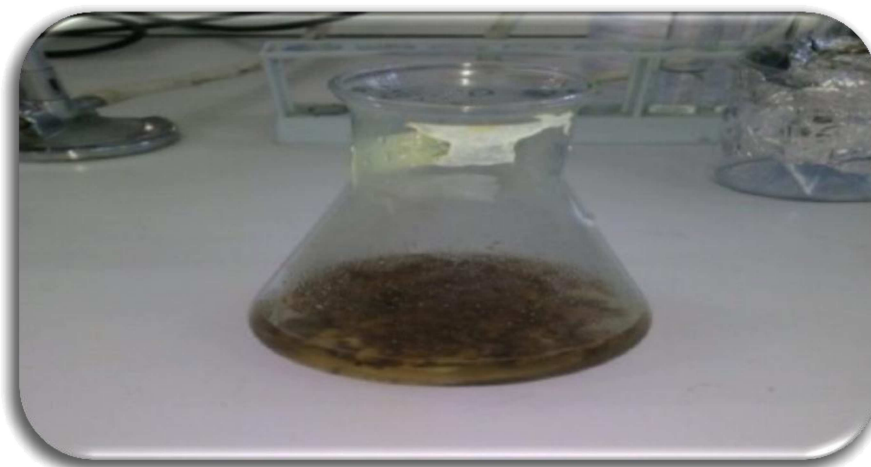


Figure 19 : La macération des échantillons.

Les différentes étapes d'extraction de propolis sont représentées dans la figure suivante.

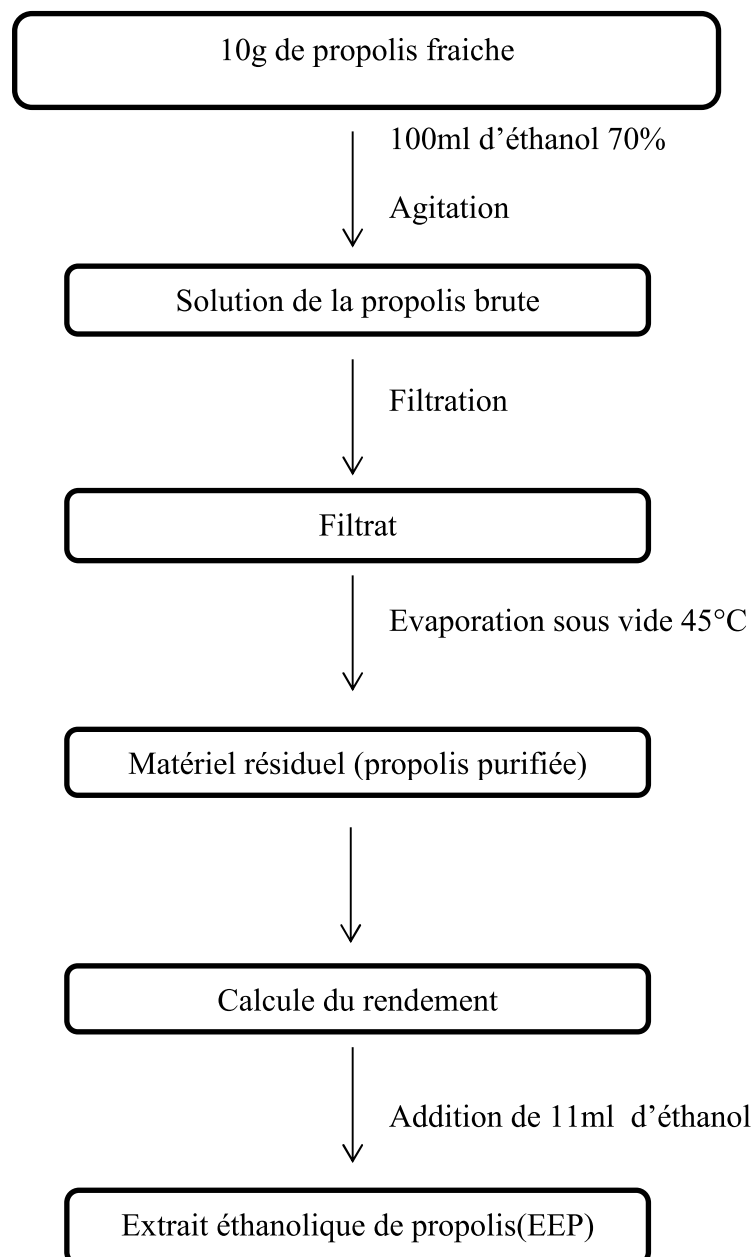


Figure 20 : Diagramme représentatif de la procédure de l'extraction éthanolique de la propolis (EEP)

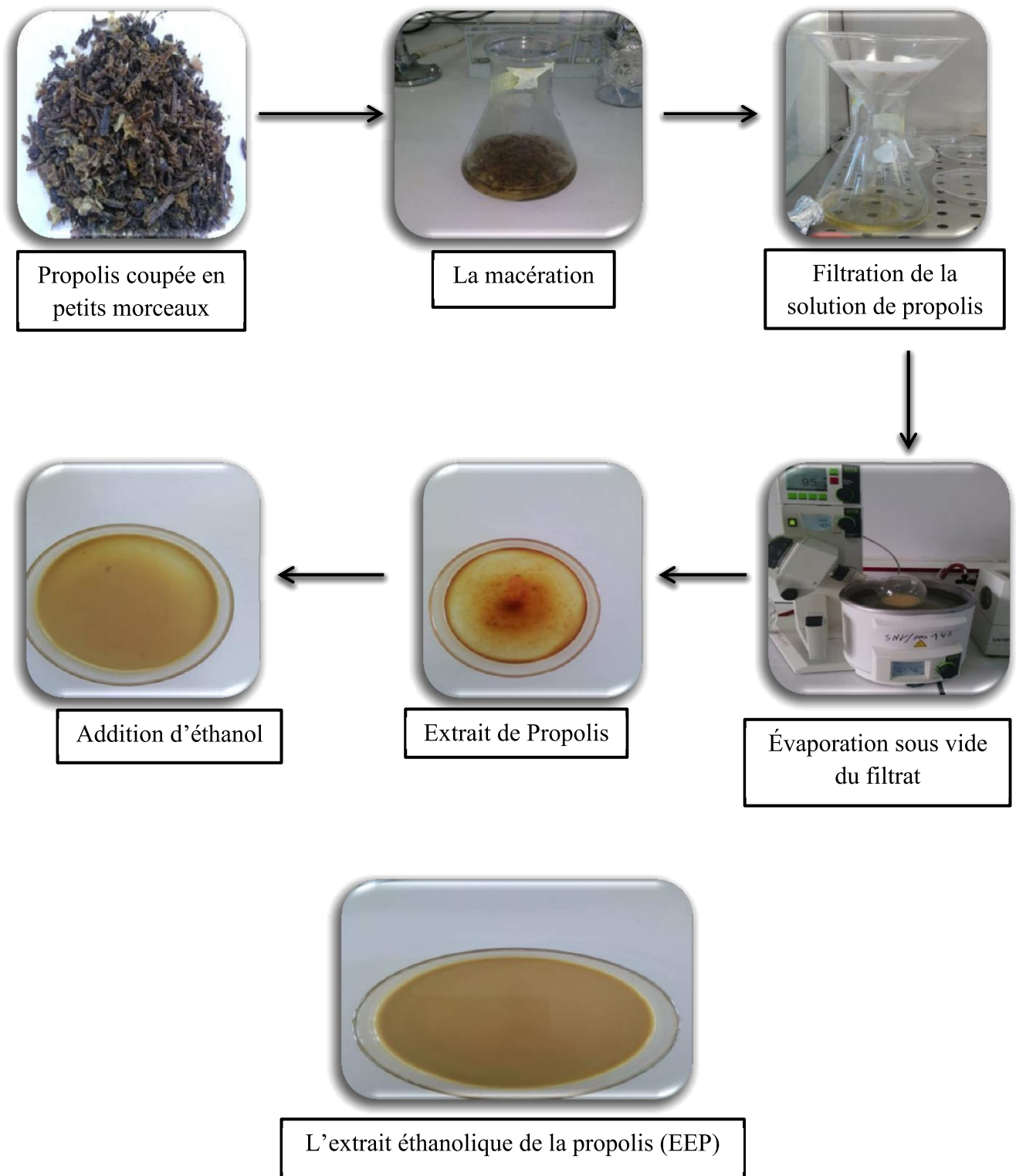


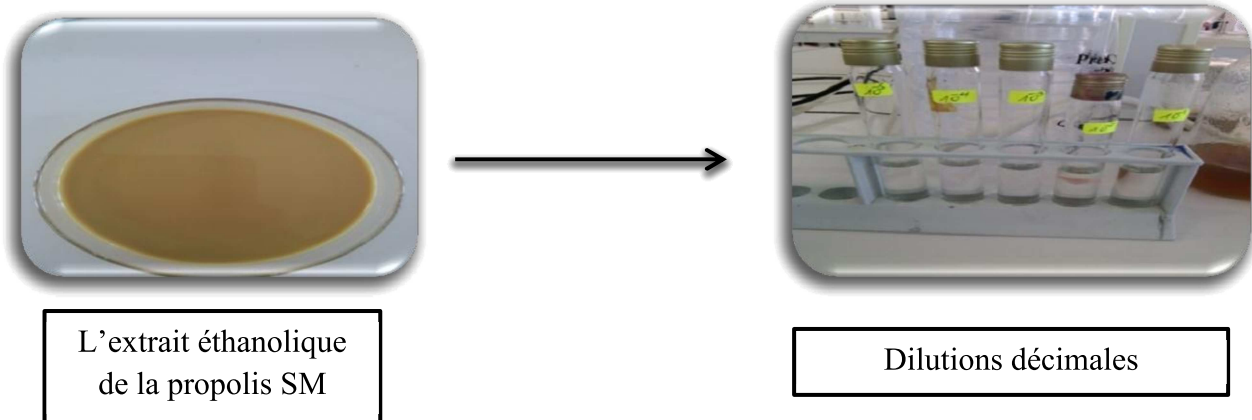
Figure 21 : Les étapes d'extraction éthanolique de propolis (EEP).

1.3.3. Préparation de la solution mère et les dilutions décimales

Selon les méthodes de routine, une série des dilutions a été réalisées.

À partir de l'extrait éthanolique de propolis (EEP), on prélève aseptiquement 1ml à l'aide d'une micropipette stérile. On l'introduit dans un tube à essai contient 9ml d'eau physiologique stérile, la dilution obtenue représente la dilution 10^{-1} .

Par la suite une série de dilutions est effectuée jusqu'à la dilution 10^{-5} . (Voir Annexe 06)



1.3.4. Préparation du milieu de culture M17

Dans un erlenmeyer stérile, on met 22,2 g de milieu de culture M17, on ajoute un volume de 600ml d'eau distillé, par la suite une quantité de 9g d'Agar Agar Microbiologique est ajouté au mélange, puis nous avons porté lentement le milieu à l'ébullition (Température 100°C) sous agitation constante, et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Le milieu est stérilisé par Autoclavage à Température 120°C pendant 30 min.

1.3.5. Préparation de l'eau physiologique

Verser une quantité de 9g de NaCl dans un litre d'eau distillée, puis agiter jusqu'à la dissolution complète du sel. La solution est stérilisée par Autoclavage à 120°C pendant 30min.

1.3.6. La recherche et le dénombrement des Lactocoques

À partir des dilutions décimales, on prend aseptiquement au moyen d'une pipette stérile 1ml de chaque dilutions, vider le contenu de la pipette dans une boîte de pétri vide sous forme de gouttes séparées comme indique la figure (Annexe N°07) ; on verse par la suite le milieu de

culture M17, préalablement fondue et refroidie, puis une agitation en huit est faite pour assurer la répartition complète de la suspension bactérienne dans la gélose.

Après refroidissement des boîtes sur la paillasse, on incube à l'étuve bactériologique à température 37°C pendant 72 heures.

Lecture : Les colonies de Lactocoques se présentent sous forme des taches blanchâtres, lisses.

Dénombrement : Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussées sur les boîtes.

1.3.7. Isolements des souches

1.3.7.1. Le repiquage

Après le dénombrement des souches, une série de repiquage a été réalisé dans le but de purifier les souches obtenues. L'isolement a été procédé par repiquage dans trois milieux de culture : Bouillon M17 stérile, Gélose M17 stérile, Eau physiologique stérile. On prélevant aseptiquement à partir de chaque boîte contenant une culture bactérienne, cinq colonies considérées comme typiques. **(Terzaghi at Sandine., 1975).**

A/ Dans la gélose M17

À l'aide d'une Anse de platine stérile, prélevé cinq colonies typiques à partir de la boîte de pétri contenant la culture bactérienne, réalisé un ensemencement en stries à la surface de la gélose M17, incubé les boîtes dans l'étuve couvercle en bas à Température 37°C pendant 24 heures.

Lecture : La croissance bactérienne traduite par la présence des colonies blanchâtres.

B/ Dans le bouillon M17 stérile

À l'aide d'une Anse de platine stérile, prélevé cinq colonies typiques à partir de la boîte de pétri contenant la culture bactérienne, introduit les colonies dans le tube du bouillon M17 stérile, incubé les tubes dans l'étuve à Température 37°C pendant 24 heures.

Lecture : La croissance bactérienne traduite par un trouble observé dans le tube.

C/ Dans l'eau physiologique

À l'aide d'une Anse de platine stérile, prélevé cinq colonies typiques à partir de la boîte de pétri contenant la culture bactérienne, introduit les colonies dans le tube d'eau physiologique stérile, incubé les tubes dans l'étuve à Température 37°C pendant 24 heures.

Lecture : La croissance des bactéries traduite par un trouble observé dans le tube.

1.3.7.2. La purification des souches

Une série de purifications est réalisées par ensemencement en stries sur la surface de géloseM17, pour l'obtention d'une souche pure qui doit être utilisée lors d'identification biochimique.

1.3.8. L'identification des isolats

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres.

1.3.8.1. Étude morphologique

1.3.8.1.1. Caractérisation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose, il permet de connaître la forme, le contour et la couleur des souches. Ces observations sont aussi déterminées à l'aide du grossissement X4 du microscope (**Guiraud., 1998**).

1.3.8.1.2. Caractérisation microscopique

Un examen microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (taille, forme et leur mode de regroupement), deux méthodes de routines ont été réalisées (la coloration de Gram et la coloration au bleu de méthylène).

✓ La coloration de Gram :

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à **Gram négatif qui apparaissent roses** et les bactéries à **Gram positif qui apparaissent violettes**. Cette différence de coloration est liée à des différences **de nature de la paroi bactérienne** (**Guiraud., 1998**).

Elle permet de renseigner sur :

- Le type Gram + ou Gram - .
- La forme des bactéries.
- La taille.
- Le mode de regroupement (**Guiraud., 1998**).

Technique (voir Annexe 08)

- À partir d'une culture de 24heure réaliser **un frottis et le fixer**.
- Plonger la lame dans le **violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué** pendant **1 minute**.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de **Lugol** pendant **1 minute**.
- Laver à l'eau distillée.
- **Décolorer trente secondes à l'alcool**.
- **Rincer immédiatement à l'eau distillée**.
- Plonger la lame dans la **safranine (ou la fushine)** pendant **1 minute**.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
- Observer à l'**objectif x100 à l'immersion** dans l'huile et à **pleine lumière (Guiraud., 1998)**.

✓ **La coloration au bleu de méthylène**

Principe

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries, les champignons, mais aussi les cellules qui sont en général mieux conservées qu'avec la coloration de Gram (**Guiraud., 1998**).

Elle permet de renseigner sur :

- La forme des bactéries.
- La taille.
- Le mode de regroupement.

Technique (voir Annexe 09)

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de **bleu de méthylène, 1 à 2 minutes.**
- Rincer à l'eau distillée.
- **Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph.**
- Observer à l'objectif **x100 à l'immersion** dans l'huile et à **pleine lumière (Guiraud., 1998).**

1.3.8.2. Test de mobilité

Un ensemencement par piqûre centrale, dans des tubes à essai contient le milieu Sabouraud en culot. Les tubes incubés à 37°C, pendant 18heures.

Lecture : Si la culture est au tour de la piqûre, la souche est immobile ; si la gélose trouvée envahissement par les bactéries, la souche est mobile.

1.3.8.3. L'identification biochimique

Les caractères biochimiques sont pris en considération, les colonies sont soumises à plusieurs tests, pour confirmer leurs identités.

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. La réaction catalysée est la suivante :



Pour confirmer la présence de cet enzyme, nous procédant à un simple test qui consiste à déposer l'équivalent d'une colonie bactérienne prélevée d'une culture jeune sur une lame en verre stérile. Deux gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées sur la culture, la présence de l'enzyme catalase est relevé par la production instantanée de petites boules d'oxygène, visibles à l'œil nu (**Guiraud., 2003 (Voir Annexe 11).**)

Lecture : La présence de l'activité catalase se traduit par le dégagement en moins de 5 secondes de bulles d'oxygène qui forme une mousse persistante (**Guiraud., 2003).**

- **Test de croissance dans différentes conditions**

- ✓ **Croissance à différentes concentrations de NaCl (4,5% ; 6,5%)**

La croissance bactérienne en présence de 4,5% ; 6,5% de NaCl a été réalisée en milieu de culture M17 liquide, réparti à raison de 5ml par tubes à essai. Par la suite les tubes sont ensemencés avec une Anse de platine stérile d'une culture de nuit des souches à tester, puis incubés à 30°C pendant 48 heures (**Guiraud., 2003**).

Lecture : Le résultat est considéré positif dans le cas d'une croissance bactérienne, et négatif s'il y a Absence de croissance en comparaison avec un tube témoin (**Guiraud., 2003**).

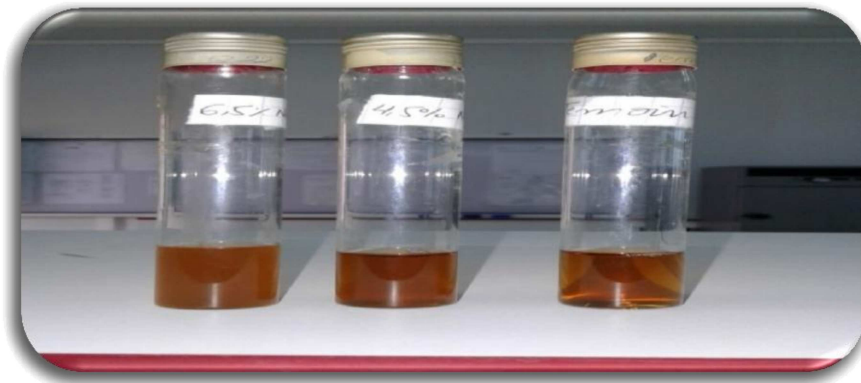


Figure 22 : Test de croissance à différentes concentrations de NaCl.

- ✓ **Croissance à différentes températures (10°C ; 45°C ; 50°C)**

Les cultures des bactéries se distinguent par leur température optimale de croissance. L'aptitude à la culture est testée à 10°C ; 45°C ; 50°C sur un bouillon M17 (**Guiraud., 2003**).

Lecture : La croissance est appréciée par l'examen des milieux (présence de trouble) après 24 heures à 72 heures en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Guiraud., 2003**).

- ✓ **Croissance à pH 9,6**

Ce test est réalisé par ensemencement des tubes de 10 ml de bouillon M17 à un pH ajusté à 9,5 (**Guiraud., 2012**).

Lecture : La croissance est appréciée par un trouble de milieu après incubation à 30°C pendant 24 heures à 72 heures en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Guiraud., 2012**).

- **Test de thermorésistance**

La thermorésistance est réalisée en milieu M17 liquide réparti à raison de 10 ml par tube, par la suite les tubes sont inoculés par la souche isolée, ensuite le tube est déposé dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, la souche est incubée à 30°C pendant 48 à 72h (**Guiraud., 2003**).

Lecture : Un résultat positif se traduit par un trouble (**Guiraud., 2003**).



Figure 23 : Test de thermorésistance.

- **La production du gaz à partir du glucose (type fermentaire)**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé. Depuis **1920, Orla-Jansen** a montré que les bactéries lactiques peuvent se subdiviser en deux groupes biochimiques : Les homofermentaires et les hétérofermentaires, la différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO_2 . Donc ce test permet de mettre en évidence le CO_2 produit. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO_2 liée à ce métabolisme particulier (**Bourgeois et al., 1996**).

Méthode : En milieu M17 liquide contenant du glucose (5g/l) au lieu du lactose. 10ml de milieu sont repartis dans des tubes à essais munis d'une cloche de Durham renversée qui permet d'apprécier la production ou non du gaz lors de la fermentation du glucose. Ces tubes sont inoculés avec une culture de nuit des souches à tester, puis incubés pendant 18 heures à 30°C. Si la souche testée produit du gaz, ce gaz s'accumule sous la cloche de Durham (Durham 1898).

Lecture : Si plus de tiers du volume de cette cloche est occupé par le gaz, la souche est considérée comme hétérofermentaire, dans le cas contraire, la souche est considérée comme homofermentaire (**Bourgeois et al., 1996**).

- **Profile fermentaire**

Pour déterminer l'attaque des sucres (saccharose, lactose et glucose) par nos souches on a utilisé un milieu qui sans sucre additionne d'indicateur de pH Rouge de Bromocresol auquel on ajoute les sucres testes a concentration finale de 2% puis le milieu estensemencées avec la suspension bactérienne, incuber à 30°C pendant 24 h à 48h. (**Guiraud., 2003**).

Lecture : La fermentation des sucres donne par les souches testée se traduit par la formation d'acide qui se manifeste par un virage de la coloration rouge en jaune marron (**Guiraud., 2003**).

1.3.9. Mise en évidence d'une interaction entre les bactéries lactiques – Lactococcus sp- et les bactéries pathogènes –E. coli-

Le pouvoir antibactérien des souches lactiques résulte de la présence de plusieurs substances inhibitrices (Acide organique, peroxyde d'hydrogène et bactériocines).

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi-solide inoculé préalablement avec une souche cible. La production de bactériocines est détectée par le pouvoir inhibiteur du microorganisme testé sur la croissance de germe cible (**Barefoot et Klaenhammer., 1983**).

1.3.9.1. Préparation des précultures des souches lactiques et les souches pathogènes

1.3.9.1.1. Préparation des précultures des souches lactiques

Après isolement et caractérisation biochimique, les souches lactiques sont activées avant leur utilisation dans le test d'inhibition par transfert sur bouillon MRS (**Terzaghi et Sandine., 1975**). Puis incubées 24 heures à 30°C afin d'obtenir des cellules jaunes avec un rendement maximal en substances inhibitrices.

1.3.9.1.2. Préparation des précultures des souches pathogènes

Avant leur utilisation dans le test d'inhibition, les souches pathogènes sont activées par transfert sur l'Eau Peptonée. Tous les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures (Guiraud., 2003).



Figure 24 : Précultures d'*E. coli*.



Figure 25 : Précultures des Lactocoques.

1.3.9.1.3. Détection de l'activité bactéricide des Lactocoques contre les bactéries pathogènes E. Coli

Après réactivations des souches (lactiques et pathogènes). Un volume de 15ml de milieu gélosé Mueller- Hinton, est coulé dans des boîtes de pétri stériles. Après solidification du milieu, qui sert comme support d'interaction, un ensemencement par inondation en surface du milieu par la suspension des souches pathogènes (*E. coli*). Les boîtes sont gardées dans la haute bactériologique à la température ambiante pendant 3 heures, pour permettre une bonne diffusion des souches cibles dans la gélose MH (Barefoot et Klaenhammer., 1983).

Des disques stériles sont déposées au centre des boîtes de pétrie, un volume de 20µl de la culture lactique est déposée aseptiquement sur les disques. L'incubation a été faite à 30°C, pendant 48 heures (Barefoot et Klaenhammer., 1983).

L'activité bactéricide, traduite par l'apparition des zones d'inhibitions, autour des disques. L'effet inhibiteur des souches lactiques isolées, a été testé sur la croissance des souches cibles (Barefoot et Klaenhammer., 1983).

Les diamètres des zones d'inhibition, apparaissent autour des disques ont été mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 02 mm (Tabak et Bensoltane., 2011). La mesure du diamètre d'inhibition Z_i ; est effectuée selon la formule :

$$Z_i \text{ en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre des disques (6mm)}$$

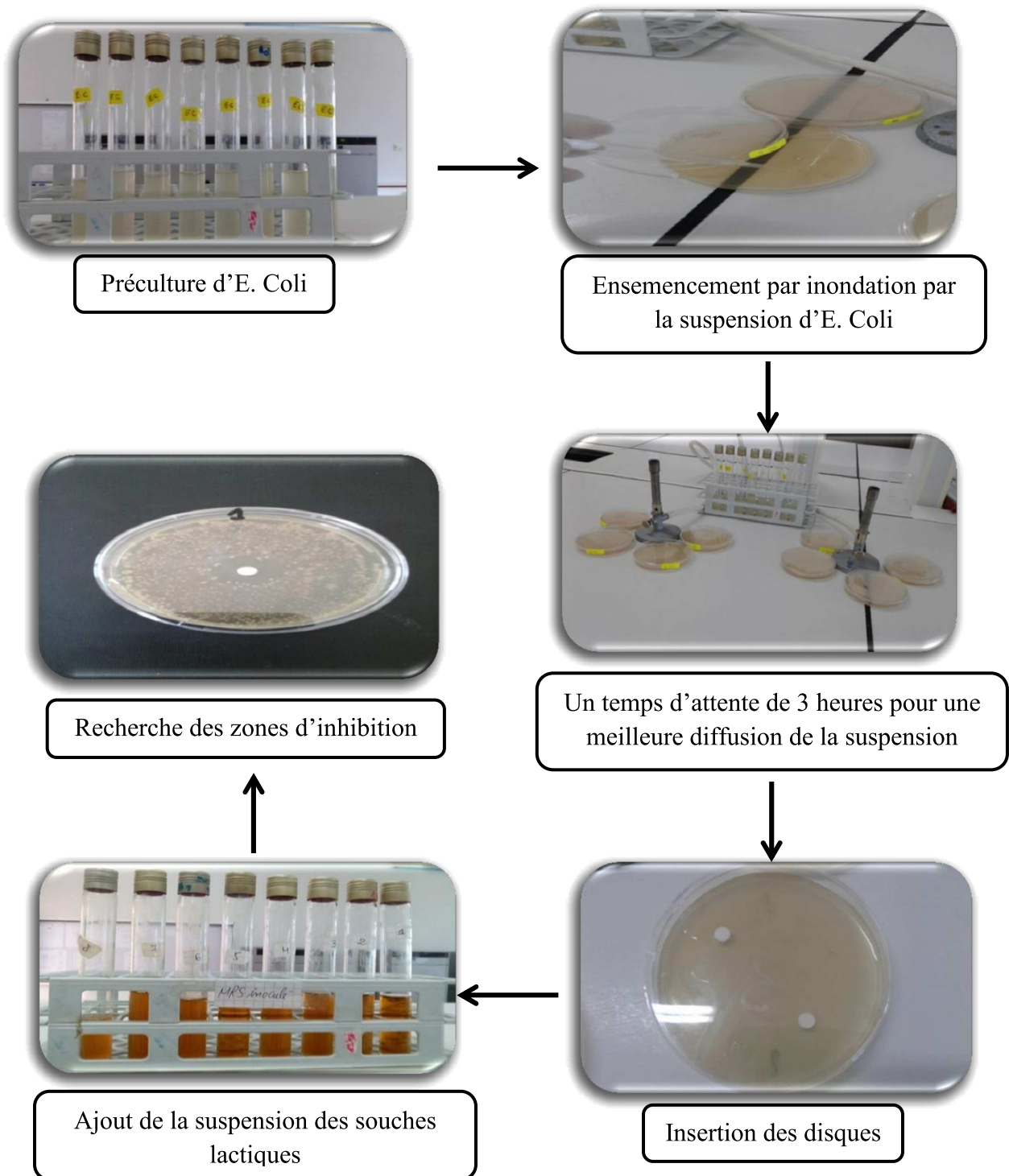


Figure26 : Les étapes de l'interaction entre les Lactocoques et E. coli.

1.3.10. La conservation des souches lactiques

1.3.10.1. À courte durée

Des cultures sur les géloses M17 inclinées en tubes de nos isolats sont gardées à 4°C, repiquées toutes les deux semaines (Saidi et al., 2002).



Figure 27: La conservation des isolats dans M17 inclinée

1.3.10.2. À longue durée

À partir de jaunes cultures (18-48h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min dans des tubes Eppendorf. Après l'élimination du surnageant, on ajoute le milieu de culture composé du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levures et 30% de glycérol, sur le culot. Les cultures sont conservées en suspension à 20°C (Saidi et al., 2002).

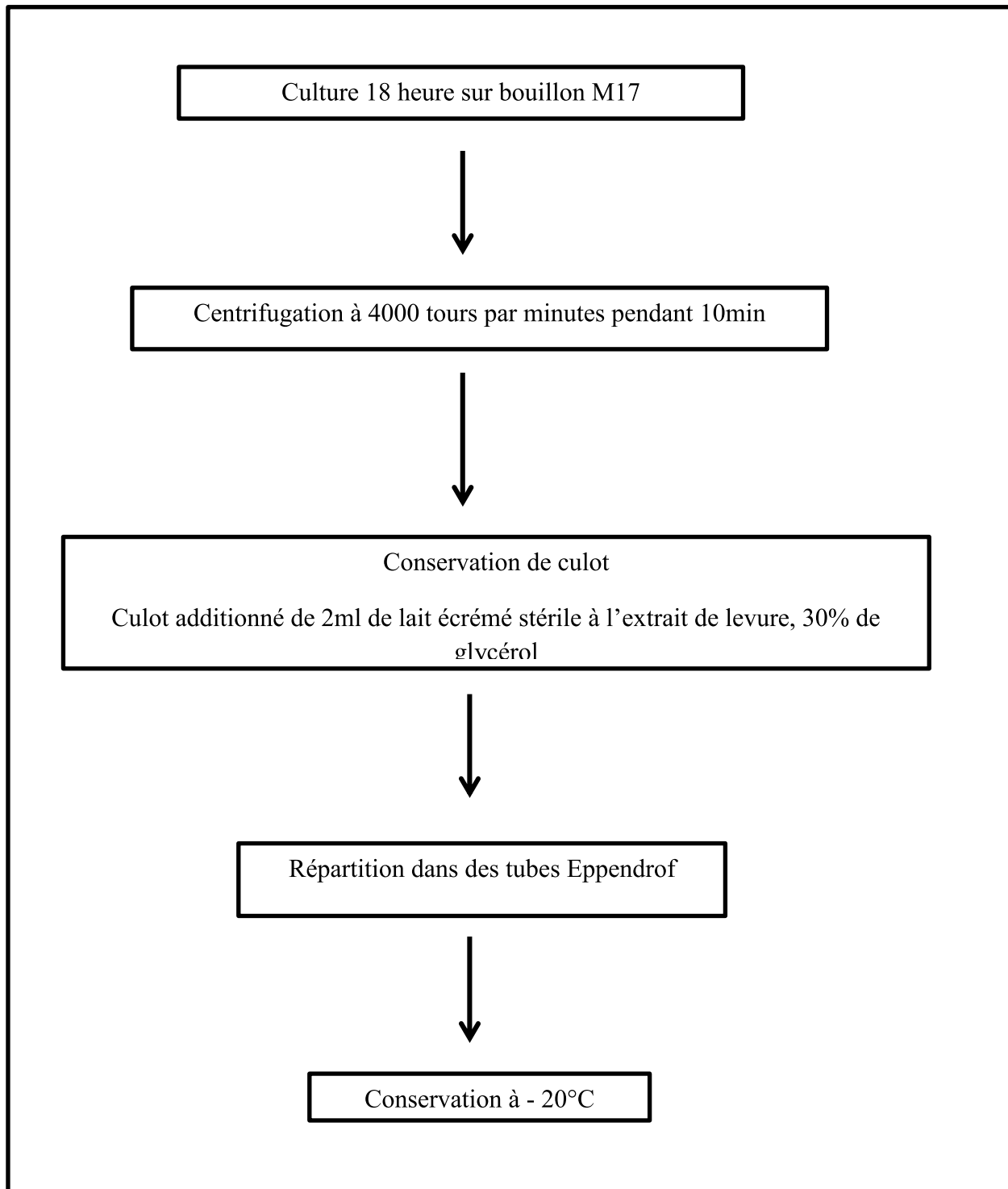
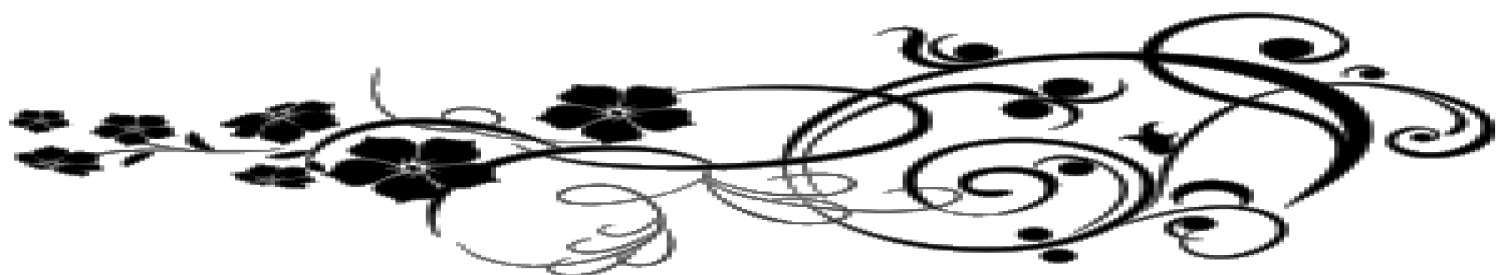


Figure 28: Schéma de conservation à longue durée des lactocoques purifiées (Saidi et al., 2002).



Partie
bibliographique



Références bibliographiques

- **Adam J; Rothman E.D; Kaer W.E and Paulino Z.L, 1977.** Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics*.**86**, p: 583-589.
- **Ait-Belgnaoui A., 2006.** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de Doctorat. Uni de Toulouse.191p.
- **Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T. et Teixeira P., (2007).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional portuguese fermented sausages) In situ assays. *Meat Science*, **76**: 796-800.
- **Alves V.F., Martinez R. C. R., Lavrador M. A. S., De Martinis E. C. P., 2006.,** Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham, *Meat Science*, **74** : 623-627.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I., (2006).**Antimicrobiol activity lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, **17**: 454-461.
- **Amrouche L., 2003.** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des *Streptocoques* lactiques mésophiles (*Lactocoques*) isolés localement. Thèse de Magistère. INA El-Harrach-Alger., 94p.
- **Anonyme, 2013.** Propolis – propolis.net.
- **Aymerich M.T., Garriga M., Monfort J. M., Nes I. et Hugas M., (2000).**Bacteriocin producing *Lactobacilli* in spanish-style fermented sausages, characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, **17**: 33-45.
- **Bankova.V, 2005.** Chemical diversity of Propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* **100(1/2)**. P: 114-117.
- **Barefoot B.T et Klaenhammer T.R ,1983.** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environ .Microbiol.***45** :1808-1815.

Références bibliographiques

- **Barefoot.S.T& Klaenhammer, TR. (1993).** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by lactobacillus acidophilus. Applied Environ. Microbial. **45**: 1808- 1815.
- **Barrefoot S. F. et Klaenhammer T. R., (1984).** Purification and characterization of lactobacillus acidophilus bacteriocin Lacticin B. Antimicrobiology Agent Chemother, **26(3)**.
- **Belliard E., Thault D. et Mathot A. G., (1996).** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In microbiologie alimentaire. Tome : 01. Ed : Techniques et Documntations. Lavoisier. Paris.523p.
- **Benazzouz D., 2012.** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle).Mémoire de Magistère. ENSA El-Harrach Alger.106p.
- **Benguettane R., 2015.** Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin. Mémoire de Master .Uni Ouargla, 56p.
- **Biri M, 2010.** Tout savoir sur les abeilles et L'Apiculture. Édition de Vecchi. Paris, p : 13-101.
- **Blanc M, 2010.** Propriétés et usage médical de produits de la ruche. Thèse: Doctorat pharmacie Université de Limoges.
- **Boukharouba N et Kirouani H., 2015.** La recherche des probiotiques (Lactobacilles et lactocoques) dans les produits de l'apiculture (la propolis). Mémoire de Master. Uni BBA.29p.
- **Bourgeois C.M et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie Alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires., Tome2. 2^{ème} édition., Technique et Documentation-Lavoisier., Paris, 523p.
- **Bradbear N, 2011.** Le rôle des abeilles dans le développement rural.**118**, p : 136-138.
- **Bull J.J, 1983.** Evolution of sex determining mechanisms. Benjamin Cummings. ED Meonlo Park. p: 67.
- **Burdock GA, 1998.** Review of the biological properties and toxicity of bee Propolis (Propolis, Food chem Toxicol. **36(4)**, p: 347-363.
- **Castaldo. S et Capasso.F 2002.** Propolis an old remedy used in modern medicine. **73(1)**, p: 1-6.
- **Celli G et Mccagnani B, 2002.** Honey bees as bioindicators of environmental pollution in proceeding of the international symposium of the ICP-BR bee protection group. Hazards of pesticides to bees. Bologna, Italy. **56(1)**, p: 137-139.
- **Chauvin, 1988.** Traité biologique de l'abeille, Tome 3.Edition Masson de Cie. Paris.

Références bibliographiques

- **Chung H. T., Monteville J. J. et Chikindas M. L., (2000).** Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria . *Letter of Applied Microbiology*, **31(6)**.
- **Codex Standard (12-1981, 1987. 2001).** Codex alimentaires commission Standard.
- **Davay G. P. et Richardson B. C., (1981).** Purification and some properties of diplococcin from streptococcus cremoris 346. *Applied and Environmental Microbiology*, **141** :84-89.
- **Donadieu. Yves, 2008.** La Propolis. Paris : Dangles.
- **Eric Debuysier, 1984.** La propolis. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nante, Faculté de pharmacie.*
- **Ghisalberti E.L, 1997.** Propolis: a review Bee world.60.p: 56-84.
- **Golder W, 2004.** Propolis The glue as presented by the graeco- Roman literature. **23**, p : 133-145.
- **Guiraud J.P.2003.**Microbiologie alimentaire. Tec et Doc, Dunod. Paris.2p :90-92.
- **Haccour.A, 1961.** *Recherches sur l'abeille saharienne au Maroc. Communication à la société des sciences naturelles et physiques du Maroc. Belg. Apic.* **25(2)**, p: 13-18.
- **Hasan F.** *Guide génétique de L'Apiculture-* Édition de L'OPIDA. Centre Apicole.
- **Houbad K., 2015.** Potentialité technologique des bactéries lactiques isolées du lait cru de Chamelle. Mémoire de Magister. Uni Oran. p : 96.
- **Hugenholtz J. et Starrenburg M. J. C., (1992).** diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* var. *diacetylaetis* and *Leuconostoc* ssp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**:17-22.
- **Jansegers E, 2007.** Les produits de la ruche. p : 16-23.
- **Jimenez-diaz R., Rios-Sanchez R. M., Desmazeaud M., Ruiz-barba J.L. et Piard J. C ., (1993).** Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **59(5)**: 1416-1424.
- **Kahia A., 2015.** Caractérisation des agents phytopathogènes responsables de la pourriture molle sur différentes plantes hôtes et essai de lutte biologique. Mémoire de Master. Uni BBA.76p.
- **Kalta T., Moretro T., Aesen I. M., Holch A., Axelsson L. et Naterstard K., (2001).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of satanic P and /or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*, **18(4)**: 431-439.

Références bibliographiques

- **Kartal M., Yaldiz S., Kaya S, Kururu S and Topçu G (2003)**. Antimicrobial activity of Propolis samples from two different region of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* **86**: 69-73.
- **Khenfer A et Fettal M, 2001**. *Le miel. Ministère de l'agriculture*. Direction de la formation de la recherche et de la vulgarisation. p: 23.
- **Klaenhammer T. R., (1993)**. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Biological Revue*, 12.
- **Kostinek M., Specht I., Edward V. A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C. M. A. P. et Holzapfel W. H., (2007)**. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342-351.
- **Krell. R, 1996**. Value- Added Product Fromm beekeeping. Bulletin n° 124.
- **Labioui H ., Laroussi E ., EL Yachioui M. et Ouhssine M., (2005)**. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin Soc Pharm. Bourdeaux*. 144 :237-250.
- **Laffargue C., 2015**. Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologie et conseils en officine. Thèse de Docteur en pharmacie. Uni toulouse III Paul sabatier. 121p.
- **Larpent J. P., (2000)**. Introduction à la nouvelle classification. Ed : Techniques et Documentation. Lavoisier Paris. 280p.
- **Larpent J.P et al 1994**. Les probiotiques en alimentation animale et Humaine. Technique et documentation. Paris. 192p.
- **Larpent J.P., 1997**. Microbiologie Alimentaire : Technique et Documentation. Paris. 1072p.
- **Le conte, 2004**. Mieux connaitre l'abeille. La vie sociale de la colonie. In : Bruneau E ; Brabançon J.M ; Bonnaffé P ; Clement H ; Domerego R ; Fert G ; Le conte Y ; Ratia G ; Reeb C ; Vaissirère B. *Le traité Rustica de l'apiculture*. Rustica Édition .Paris, p : 12-83.
- **Lee N. K. et Paik H. D., (2001)**. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 molted from jeat, gal. *Food Microbiology*, 18(1): 17-24.
- **Lèjeune B; Pourrat A et Dehmouch H, 1988**. Propolis utilisation en dermocosmetologie, Parfums, cosmétique, Aroms. **73** ; p : 77, 82.

Références bibliographiques

- **Leloir Y., Nouaille S., Ribeiro L., Commissaire J., Corthier G., Gilbert S., Chatel J. M., L'haridon R., Gruss A. et Langella P., (2001).** *Sécrétion des protéines d'intérêt thérapeutique chez Lactococcus lactis.* Lait: 81.217-226.

- **Leven L.V; Boot W-J; Mutsaers M; Segeren P et Velthuis H, 2005.** *L'Apiculture dans les zones Apicoles.* p : 35-45.

- **Mailly C., 2010.** Les probiotiques, Du conseil officinal à la prise en charge micronutritionnelle. Thèse de Docteur en pharmacie. Uni Nancy1.199p.

- **Marcucci M.C, 1995.** Propolis : chemical composition biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* (26). P : 83-99.

- **Mari B., 2011.** Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries sur le Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM). Mémoire de maîtrise. Uni du Québec à Montréal.95p.

- **Mathivanan V; Shah G.N; Mansoor M; Salvisbhanaykan; Mir. G, 2003.** A review on Propolis – As-a Novel Folk Medicine. *Indian J. Sci* 2(3), p: 23-30.

- **Mechai A., 2009.** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat. Uni Annaba.101p.

- **Metlef S., 2008.** Effet antagoniste de Lactococcus Lactis, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Mémoire de Magistère. Uni Chlef. p : 123.

- **Mofradj Z., 2014.** Contribution à l'étude de conservation d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin. Mémoire de Master. Uni Ouargla. p : 58.

- **Moroni, O (2007).** Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.146p.

- **Moudir Naima, 2004.** Les polyphénols de la propolis algérienne. Thèse de magister en chimie *Université Mohammed Boudiaf, M'sila.*

- **Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V. et Holo H., (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 2-4.

Références bibliographiques

- **Paillot A; Kirkors; Graanger A.M, 1949.** *L'abeille, Anatomie, maladies*, Édition de trevous. p: 172.
- **Piard J. C. et Desmaseaud M., (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria .2- bacteriocins and other antibavterial substances. *Lait* ,72: 113-142.
- **Prost PJ, 1979.** Apiculture. Paris Baillière JB.
- **Ravazzi.G, 2003.** Abeilles et apiculteurs. Ed. De Vecchi, Paris, p:155.
- **Ray B., (1992).** Pediocin of pediococcus acidilactici as food bioperservatives in food., p : 66.
- **Richard J., (1996).** Utilisation des bactériocines pour la production des aliments plussûrs : mythe ou réalité. *Lait*, 76 : 269-274.
- **Schultsz C., Van Den Berg F. M., Ten Kate F. W., Tytgat G. N. et Dankert J., (1999).** The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117:1089-1097.
- **Saidi. N, Guessas. B, Bensalah. F, Badis. A, Hadadj. M, Henni D.E, Previst. H,Kihal. M,(2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des regions arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions arides*.01. p : 01- 04.
- **Sourat : l'abeille**, verset : 68-69.
- **Straub P, 2007.** *L'abeille sentinelle écologique.*, p :87.
- **Sutra L., Federighi M. et Jouve J. L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : Polytechnica, Paris, **308(6)** :31-249.
- Tabak S et Bensoltane A, 2012.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis- à- vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature et technologie*.6 :71-79.
- **Tabti M., 2008.** Effet de *Lactococcus lactis* locales sur des bactéries pathogènes impliquées dans la pathologie digestive in vitro. *Mémoires de Magistère. Uni Chelef*, 94 p.
- **Tagg J. R., Dajoni A. S. et Wannamber L. W., (1976).** Bacteriocin of gram positif bacteria., *Bacteriological revue*, **40**: 722-756.
- **Tautz, 2009.** *L'étonnante abeille.* Édition Deboeck, Bruxelles, Belgique, p : 277.

Références bibliographiques

- **Thuhault D. et Quimper A., (1997).** Interactions microbiennes : si leur maîtrise n'était conté. *Food Technology*, **17**: 18-19.

- **Toullec A.N.K, 2008.** Abeille noire, *Apis mellifera*, historique et sauvegarde. Thèse de doctorat faculté de médecine de CRETEIL. Seine Martine.**85** ; p : 45.

- **Ugur.A et Arslan.T, 2004.** An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med food*. **7**. p : 90-94.

- **Van Den Berg D. J. C., Robijn G. W., Janssen A. C., Guiseppin M. L. F.,vreeker R, Kamerling J. P.,Vliegthart J. F. G., Ledeboer A. M. et Verrips C. T., (1995).** Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 2840-2844.

- **Viel C et Dore JC, 2003.** History and uses of honey. Mead hive products. *Rev Hist Pharm (Paris)*; **51**, p: 7-20.

- **Volpert.R et Elstner. F, 1993.**Biochemical activities of extracts. Part I : Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Z Naturforsch C*. **48 (11/12)**. p : 851-857.

- **Warré. A, 2005.** Apiculture pour tous, 12ème Édition., p : 90.

- **Wendling S, 2012.** *Varroa destructor* (ANDERSON et TRUMAN, 2000), un acarien ectoparasite de l'abeille domestique *Apis mellifera*. LINNAEUS, 1758. Revue bibliographique et contribution à l'étude de sa reproduction. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine. Créteil. p : 190.

- **Wilson W.T, 1971.** Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus* larvae spores ingested by adults. *J. Invertebr. Pathol*, **17**, p: 247-255.

- **Winston M.L and Punnet E.N, 1982.** Factors determining temporal division of labor in honey bees. *Can. J. Zool*. **60**, p: 2947-2952.

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant, de nous avoir guidé tout au long de notre vie, dans toutes les années d'étude et nous avoir donné la croyance, la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Ce mémoire est le fruit de collaboration de personnes exceptionnelles par leur gentillesse et leur professionnalisme et dont l'appui était d'une grande efficacité.

Nous adressons notre reconnaissance et nos plus sincères remerciements à notre promoteur, Monsieur BELHADJ Mohamed Tayeb, Maitre -assistant A et Chef de département d'Agronomie à Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A, pour ses conseils scientifiques judicieux, et l'aide qu'il nous a apporté dans la réalisation de ce travail et surtout pour ses qualités humaines.

Nous remercions également Monsieur Mr ALILI Dahmane, professeur à Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.

Nos plus sincères remerciements vont également à Mme SOUAGUI Yasmina, professeur à l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos chaleureux remerciements s'adressent à Monsieur AYACHI Ammar, Professeur à Université de Batna, pour ses encouragements, sa disponibilité exceptionnelle, son inquiétude son aide qu'elle nous a apporté durant toute la période de réalisation de ce travail et d'avoir nous permis d'accéder à son laboratoire de Bactériologie à l'Université de Batna.

Nous adressons particulièrement notre reconnaissance à Monsieur MERIBAI Abdelmalek, professeur à l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. nous le remercions infiniment pour son assistance rigoureuse et les compétences dont il nous a fait bénéficier dans le domaine de la microbiologie. Nous lui adressons également, notre gratitude pour son aide précieuse dans la réalisation de ce modeste travail.

Nos remerciements les plus respectueux vont également à Madame MOHAMMEDI Salîha et Monsieur BETTACHE AZZEDDINE, Professeurs à Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. pour leurs aides, leurs conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions beaucoup Monsieur BENNAIDJA SAMIR, Ingénieur Agronome « Apiculteur » et toute personne qu'elle nous aide à collecter la propolis. Aussi un remerciement très particulier à notre amie Melle DAACI Souad qu'elle nous aide à obtenir le milieu de culture M17.

Nous remercions vivement notre chère amie, Melle BENGOUGA R, pour ses encouragements, ses conseils, son soutien morale et pour tout ce qu'elle nous a apporté tout au long de la réalisation de ce travail surtout. pour sa gentillesse et son aide efficace.

Nous tenons à exprimer notre gratitude au personnel des laboratoires pédagogiques de l'université de BBA, et au personnel des bibliothèques de l'université de Sétif et de l'université de Batna pour leurs facilités que nous ont accordé, surtout Mr. Nkfilî Abdelghani, responsable du laboratoire de microbiologie de l'Université de BBA, nous adressons notre profonde reconnaissance pour leur soutien et leur infini gentillesse.

Nous remercions également BOUZIDI F et BENANI M , pour leurs appui et leurs sympathie. Une motion particulière est fait à toute la promotion de 2^{ème} année Master, Analyse et contrôle de qualité des denrées alimentaires de l'Université de BBA (2016-2017), ainsi tout les enseignions, collègues et amis.

Enfin, nous tenons à adresser, notre respect et nos vifs remerciements à nos familles, pour leurs soutien et encouragements et à toutes les personnes ayant apporté leur contribution, de près ou de loin à notre travail.

1. Résultats

1.1. Dénombrement des lactocoques

Après 72 h d'incubation à T° 37°C, les souches ont poussées dans un milieu de culture M17, les résultats de dénombrement des colonies par échantillons sont rassemblés dans le tableau N° IX :

Tableau IX: Dénombrement des lactocoques dans milieu de culture M17 (UFC/g)

Echantillon	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵
E1	25	19	10
E2	IND	IND	80
E3	IND	148	56
E4	IND	IND	IND
E5	08	04	03
E6	IND	IND	IND
E7	IND	IND	90

IND : Indénombrable

1.2. Isolement des souches lactiques

1.2.1. Le repiquage

1.2.1.1. Le repiquage sur gélose M17

Les colonies apparaissent, de couleur blanchâtre, ronde, et de taille variable. On trouve des colonies à contour régulier et d'autre à contour irrégulier.

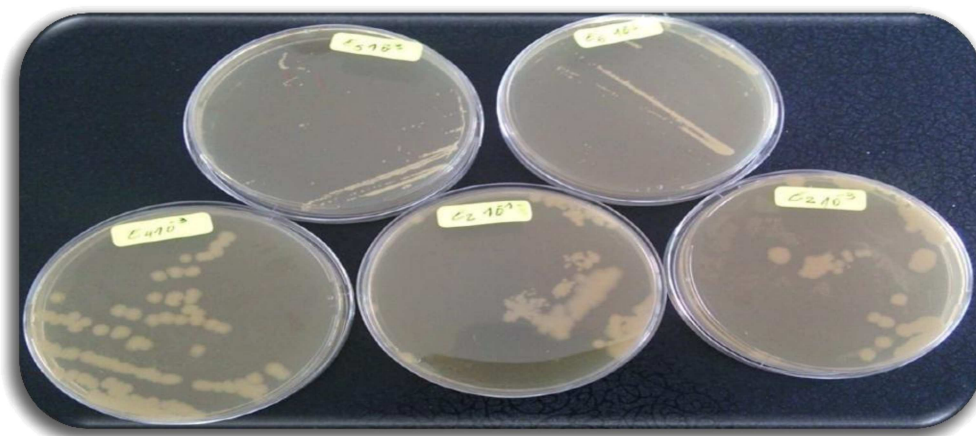


Figure 29: Aspect des colonies après repiquage sur gélose M17.

1.2.2. Le repiquage sur Bouillon M17

Un trouble caractérise les tubes du bouillon M17, ce qui indique la présence d'une croissance bactérienne.



Figure 30 : Croissance des souches lactiques après repiquage dans le bouillon MRS.

1.2.3. Le repiquage dans l'eau physiologique

Un trouble caractérise les tubes d'eau physiologique, ce qui indique la présence d'une croissance bactérienne.



Figure 31: Coissance des souches lactiques après repiquage dans l'eau physiologique

1.2.2. La purification des souches

Après une série d'ensemencement par stries sur gélose M17, les colonies apparaissent de couleur blanchâtres et rondes.



Figure 32: Aspect des colonies après ensemencement par stries sur gélose M17.

1.3. Identification des isolats

1.3.1. Etude morphologique

1.3.1.1. Aspect Macroscopique

L'examen macroscopique des isolats sur milieu gélosé M17 révèle l'aspect des colonies. Nous avons remarqué des colonies rondes parfois bombées de couleur blanchâtres, de taille variable avec une surface lisse. Parmi lesquelles on trouve des colonies à contour régulier ou non.

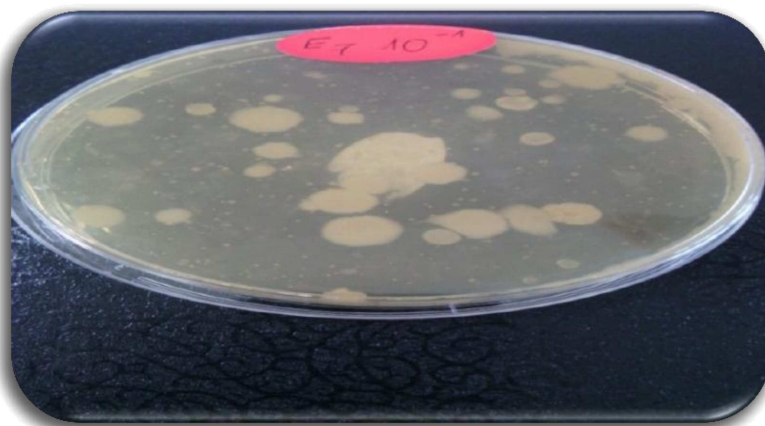


Figure 33 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17.

1.3.1.2. Aspect microscopique des colonies

1.3.1.2.1. Coloration du Gram

La coloration de Gram montrée que les souches isolées à partir de la propolis est de couleur violet «Gram+» (figure 44) ; et l'observation au microscope révèle des coques, et les cellules se présentent groupées en paires ou en chaînettes, elles sont immobiles.

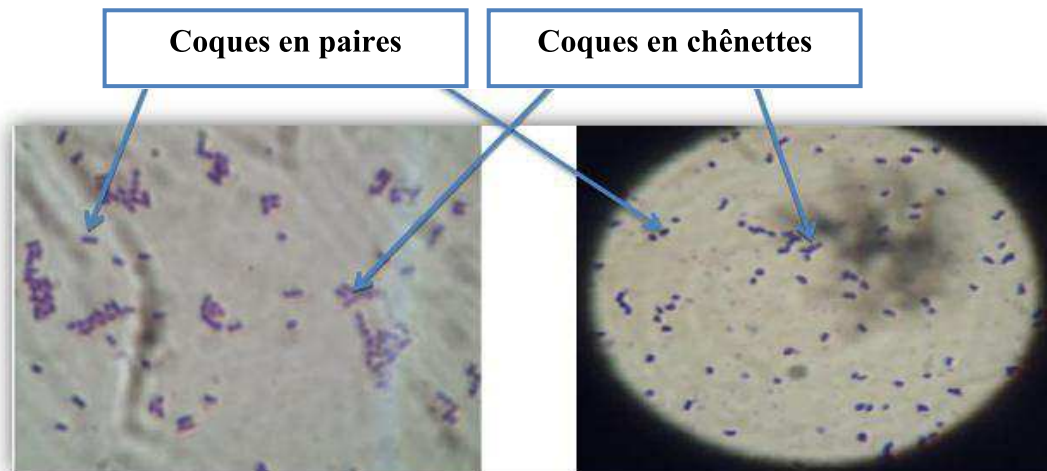


Figure 34 : Coloration de Gram

1.3.1.2.2. Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène montrée que les souches isolées sont des coques, et sont présentes isolées.

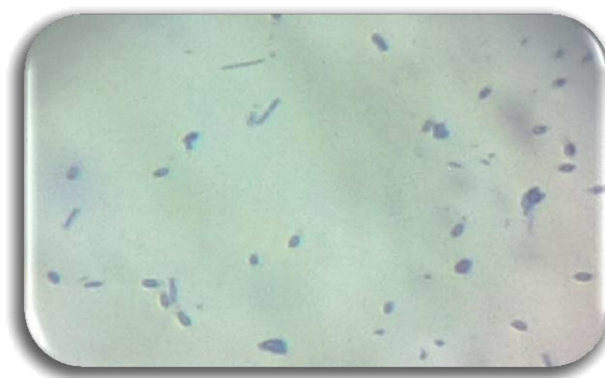


Figure 35: La coloration au bleu de méthylène.

1.4. Test de mobilité

La réalisation du test de mobilité montrer l'immobilité de toutes les souches.

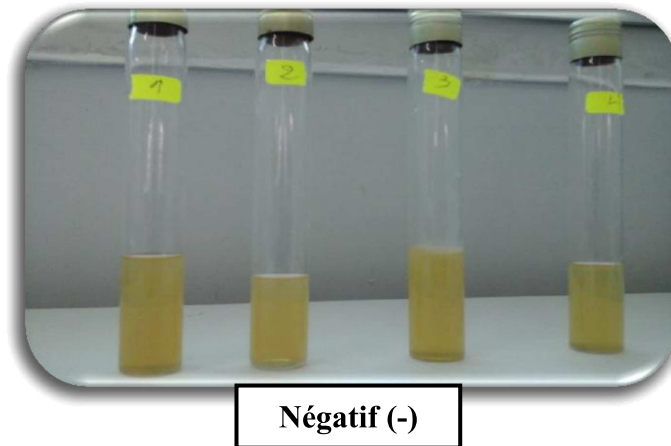


Figure 36: Test de mobilité.

1.5. Identification biochimique des isolats

1.5.1. Test de catalase

L'absence de bulles d'oxygène pour tous les souches. Ce qui indique que les souches sont catalase Négatif.

1.5.2. Croissance à différentes conditions

1.5.2.1. Croissance dans différents concentrations de NaCl

Apparition d'un trouble dans les tubes qui contient le milieu de culture M17 additionnée de 4,5% de NaCl, mais pas de croissance dans les tubes qui contient le milieu M17 additionnée de 6,5% de NaCl, ce qui indique la non résistance des souches à la croissance dans un milieu hypersalé.

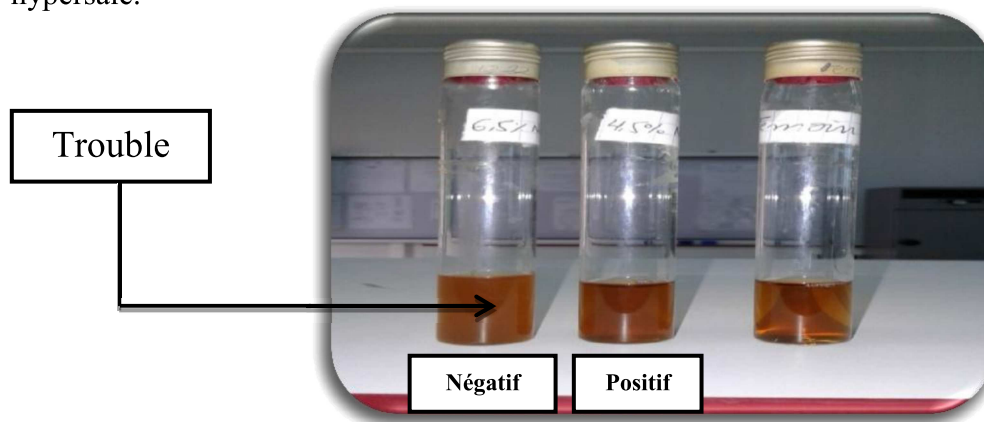


Figure 37: Test de croissance dans différentes concentrations de NaCl.

1.5.2.2. Croissance dans différents températures

Les souches isolées à partir de la propolis, présentent une réaction positive à température 10°C et un trouble été remarqué dans les tubes ce qui indiquer la résistance des souches à cette température.

La culture des isolats à la température 46°C et 50°C à monter que les souches sont incapables de poussées à cette température.

- **Température 10°C** : Présence de thermorésistance
- **Température 45°C** : Absence de thermorésistance
- **Température 50°C** : Absence de thermorésistance

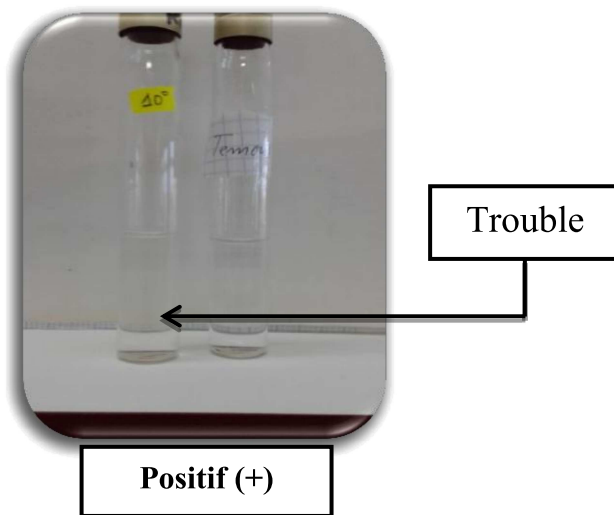


Figure 38: Test de croissance à 10°C



Figure 39: Test de croissance à 46°C



Figure 40: Test de croissance à 50°C.

Le tableau N° X représente les résultats du test.

Tableau X : Résultats du test de croissance à différentes températures (10°C, 30°C, 46°C, 50°C).

Températures	Souches testées						
	01	02	03	04	05	06	07
10°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
46°C	-	-	-	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-	-	-	-

1.5.2.3. Croissance dans un milieu à pH 9,6

Absence de trouble pour tous les isolats, ce qui indique que les souches sont incapables de pousser à pH 9,6.

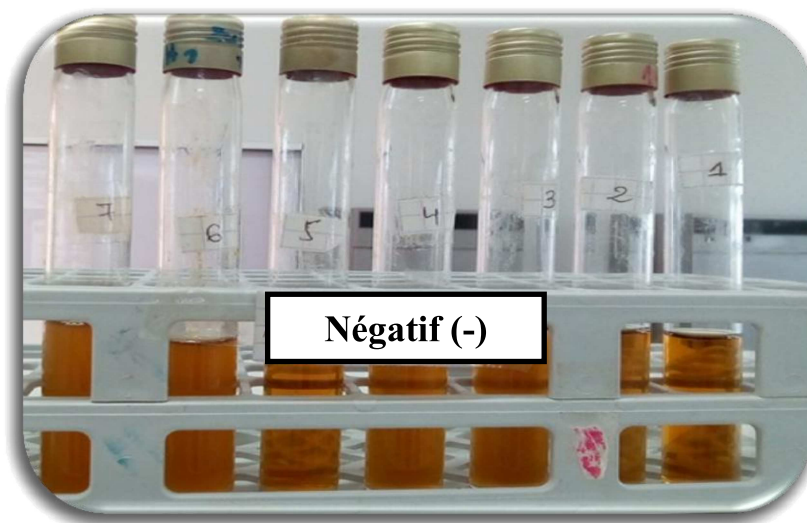


Figure 41: Test de croissance dans un milieu à pH 9,6.

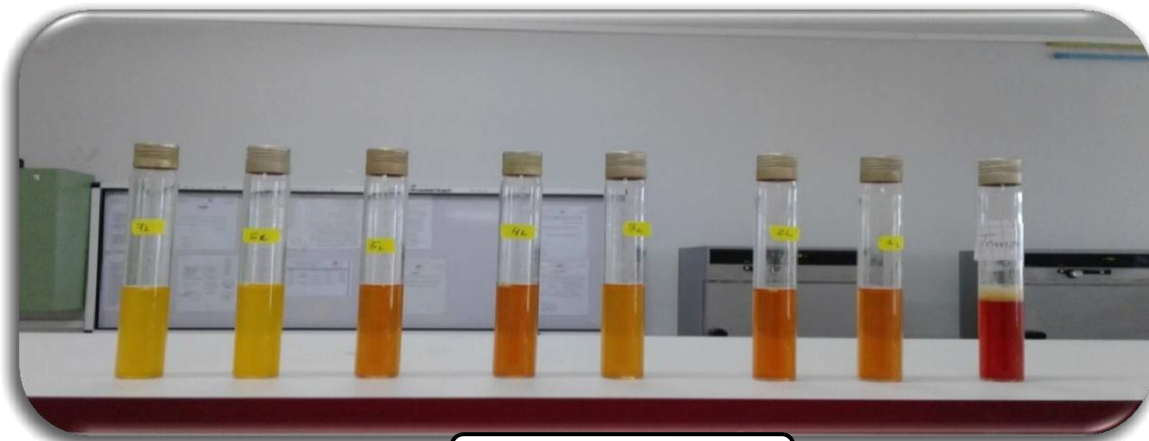
1.6. Fermentation des sucres

Les souches testées sont capables de fermenter les sucres (Glucose, Saccharose, Lactose) et un virage de couleur est observé dans tous les tubes (Rouge violet → Jaune marron), alors les tests sont considérés comme positifs.



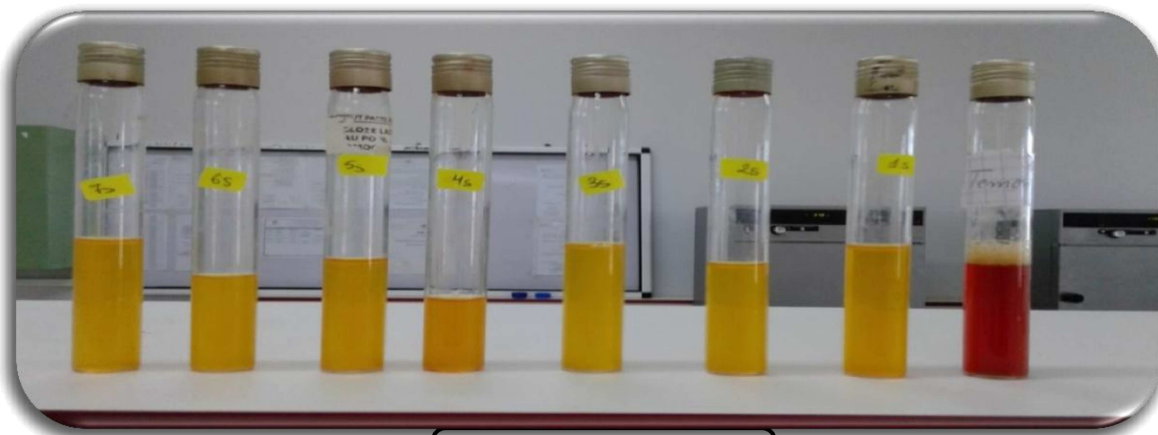
Positif (+)

Figure 42: Test de fermentation des sucres (Glucose).



Positif (+)

Figure 43: Test de fermentation des sucres (Saccharose).



Positif (+)

Figure 44: Test de fermentation des sucres (Lactose).

Le tableau N° XI représente les résultats de test de fermentation des sucres testés.

Tableau XI : La fermentation des sucres par les souches testées.

Les sucres testés

Les souches testées	Glucose	Saccharose	Lactose
01	+	+	+++
02	+++	+	+++
03	+++	++	+++
04	+++	+	++
05	+++	+	+++
06	+++	+++	+++
07	+++	+++	+++

Symboles: +++ : dégradation importante, ++ : dégradation modérée, + : dégradation moins importante

1.7. Test de thermorésistance

Le test montré que les lactocoques ne possèdent aucune résistance aux hautes températures, et aucun trouble lié à une croissance bactérienne n'est remarqué dans les tubes.

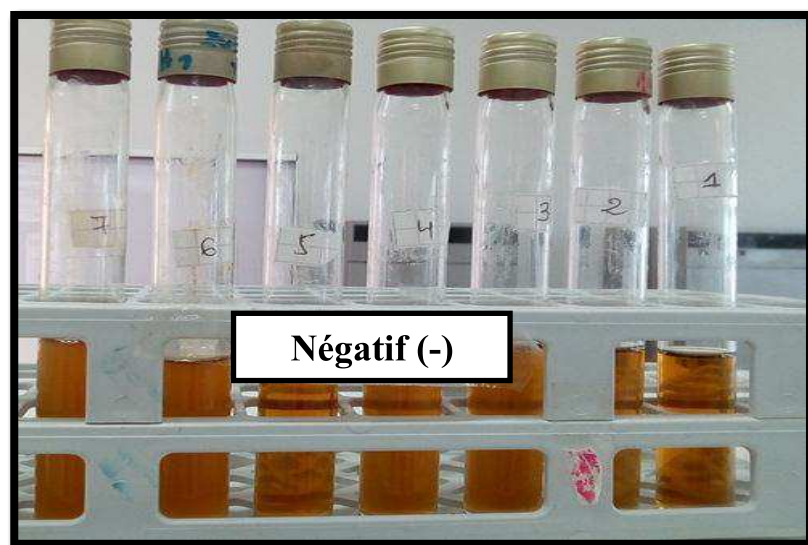


Figure 45: Test de thermorésistance.

1.8. Test de type fermentaire (fermentation du glucose)

Absence du gaz dans les cloches de Durham montré que les souches testées ne produisant pas le CO₂ à partir du glucose.

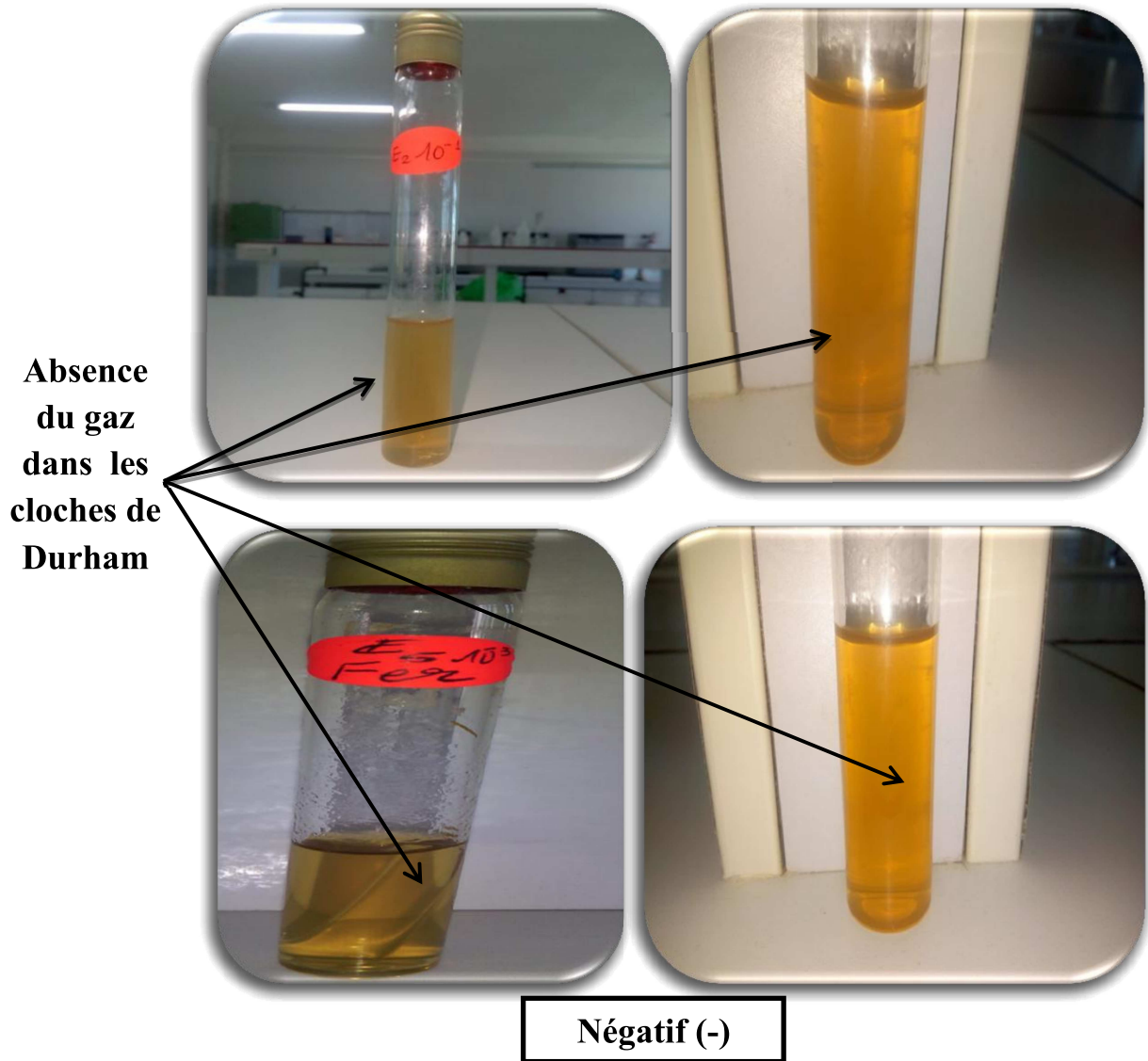


Figure 46: Test du type fermentaire.

Tableau XII: Les caractères physiques, phénotypiques et biochimiques des souches étudiées.

Tests	Les souches testées						
	01	02	03	04	05	06	07
Macroscopique	Colonies blanchâtres, arrondie de diamètre variable.						
Microscopique :							
Morphologie	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Croissance à :							
10°C	+	+	+	+	+	+	+
46°C	-	-	-	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en présence de Nacl :							
4,5%	+	+	+	+	+	+	+
6,5%	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-
Résistance 30min à 63°C	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+

1.9. Mise en évidence des effets inhibiteurs des lactococcus sp contre les Gram⁻ pathogènes (E. Coli).

Le diamètre des zones d'inhibitions relevées, varie de 2cm (plus faible activité observée pour les souches 02 et 07) à 2,7 cm (plus grande activité observée pour la souche 05).

Les résultats obtenus au niveau de la figure ont démontré la présence de zones d'inhibition autour des disques traduisant une activité inhibitrice des souches (Lactocoques sp) contre les souches pathogènes (E. Coli). Le tableau N°XIII représente les moyennes des diamètres des zones d'inhibition exprimée en centimètre pour chaque souche isolée.

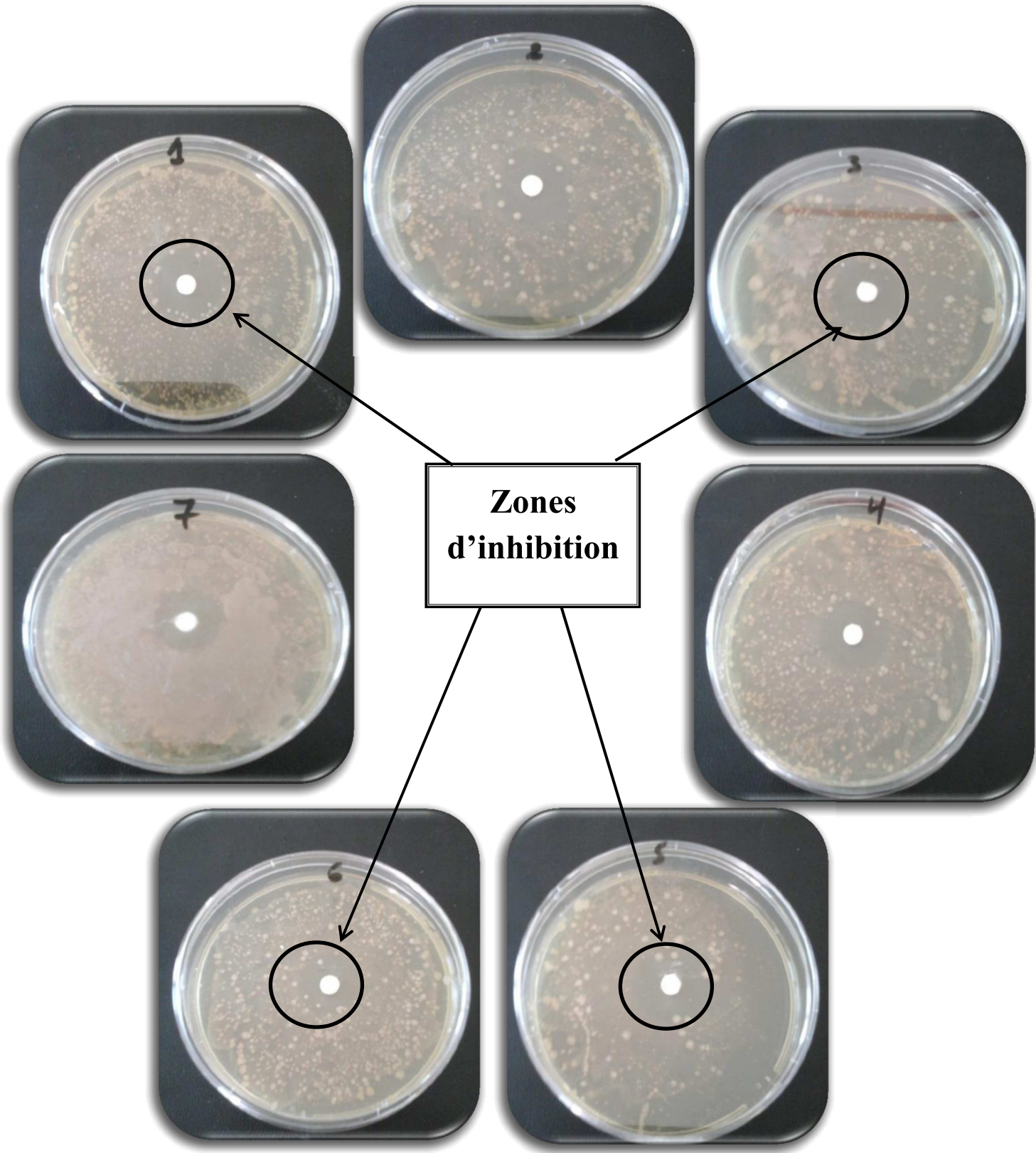


Figure 47: Les résultats de l'interaction entre les Lactococcus et E. coli.

Tableau XIII: Les résultats de l'interaction entre les Lactocoques sp et E. Coli (Les zones d'inhibition en millimètre).

Les souches testées	01	02	03	04	05	06	07
Le diamètre moyenne de zone d'inhibition en millimètre (mm)	25	20	26	24	27	23	20
ZI= diamètre de la zone d'inhibition-6mm (diamètre du disque)	19	14	20	18	21	17	14

Symboles :

ZI : Zone d'Inhibition

■ : Le diamètre de la zone d'inhibition le plus petit.

■ : Le diamètre de la zone d'inhibition le plus grand.

Résumé

Ce travail est porté sur la recherche de la microflore qui peut être trouvée dans la propolis, notamment les bactéries lactiques, aussi l'identification biochimique des souches éventuellement présentent et la mise en évidence de leur effet bactéricides contre les bactéries pathogènes.

La propolis, cette fameuse matière est très précieuse à cause de ses propriétés thérapeutiques qui sont liées directement à sa composition.

Dans un souci de la valorisation de ce produit, nous avons voulu apporter notre modeste contribution en analysant 7 échantillons de propolis récoltés de différentes régions de l'Algérie. La caractérisation biochimique des souches lactiques isolées à partir de la propolis constituent un point de départ pour ce travail.

La partie expérimentale révèle que les souches isolées à partir de la propolis ont les caractères biochimiques et physiologiques des lactocoques ainsi pour le test de l'interaction entre ces souches et E. Coli montre l'effet inhibiteur des lactocoques avec un large spectre d'action.

Mots clés :

Propolis, Lactocoque, Identification biochimique, Effet bactéricides, Valorisation, Caractérisation. Interaction

ملخص:

هذا العمل تركّز علي البحث عن البكتيريا التي يمكن أن تتواجد في العكبر، خاصة البكتيريا اللبنية ، وأيضا تحديد الكيمياء الحيوية لها و كذا تسليط الضوء على تأثيرها المميت تجاه البكتيريا الممرضة.

العكبر ، هو تلك المادة ذات القيمة العالية لما يحتويه من خصائص علاجية مرتبطة بالعناصر المكونة له و من أجل تقييم هذا المنتج، أردنا أن نساهم بهذا العمل المتواضع من خلال تحليل 7 عينات تم الحصول عليها من مناطق مختلفة من الجزائر. الخصائص البيوكيميائية للبكتيريا اللبنية المعزولة من العكبر هي نقطة البداية لهذا العمل. وكشف الجزء التطبيقي لهذا العمل أن البكتيريا المعزولة لها خصائص بيوكيميائية وفسولوجية مماثلة للبكتيريا اللبنية المراد البحث عنها بالإضافة إلى أن تجربة التفاعل أثبتت الأثر المثبط للبكتيريا اللبنية تجاه البكتيريا الممرضة .

كلمات البحث:

العكبر ، البكتيريا اللبنية تحديد الكيمياء الحيوية، التأثير المميت ، تقييم، التفاعل، الخصائص

Conclusion

Notre travail est une contribution à la valorisation de la propolis, par l'étude de sa microflore notamment les bactéries lactiques éventuellement présentes. Pour cela nous avons procédé à l'isolement, la purification et l'identification biochimique des lactocoques dans quelques échantillons de la propolis prélevés de différentes régions.

Les résultats obtenus sont satisfaisantes puisque nous avons pu isoler 7 souches appartenant au genre *Lactococcus* sp. Ils'agit probablement de l'espèce *Lactococcus lactis*.

Nous avons aussi étudié l'effet inhibiteur vis-à-vis une souche pathogène et nous avons obtenu une zone d'inhibition importante ce qui explique les indications thérapeutiques de la propolis en tant que anti-infectieux

Enfin, nous pouvons dire que la propolis est une substance de miracle, avec sa richesse en probiotiques, et reste le meilleur remède naturelle grâce à l'activité antibactérienne qu'elle possède.

En perspective, il serait intéressant d'envisager les études suivantes :

- ❖ Etude des différents facteurs qui influent sur la quantité et la qualité des probiotiques existant dans la propolis en augmentant le nombre des échantillons (la période de récolte, les conditions de stockage, la race des abeilles, l'origine et d'autres facteurs).
- ❖ La purification des souches isolées et leur identification jusqu'à l'obtention de l'espèce.
- ❖ Elargir la gamme des souches testées par l'introduction d'autres espèces intestinales concernant l'effet inhibiteur.
- ❖ Etude des substances produites par les lactocoques qui sont responsables de l'effet inhibiteur (Bactériocine et acide lactique).
- ❖ Essai de sélection des souches probiotiques à usage industriel pour la fabrication des aliments fonctionnels.