



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

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

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 biologique



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science alimentaire

Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Intitulé

**Identification des bactéries probiotiques présente dans la
propolis (lactobacille)**

Présenté par : HADJIDJ SIHAM
MABREK AICHA

Soutenu le : 02/07/2019

Devant le jury :

Président : M^m HADDACHE LAMIA MMA (Univ Mohamed ElBachir El Ibrahimi BBA)
Encadrant : M^r BELHADJ M^{ed} TAYEB MMA(Univ Mohamed ElBachir El Ibrahimi BBA)
Examineur : M^m IRATNI NADJET MMA (Univ Mohamed ElBachir El Ibrahimi BBA)

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

On remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé nos pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront notre devise.

Suite à l'achèvement de ce modeste travail, on tient tout particulièrement à remercier notre promoteur M^r Belhadj.Mohamed tayb.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, à la présidente M^{me} Haddache Lamia, à l'examinatrice, M^{me} Iratni Nadjet

On tient également à rendre hommage à toute les personnes qui été la a répondre a nos questions et qui ont donné un plus pour se travail, particulièrement à MmeBougerra.A, Mme Fatmi.W, Mme Mohamadi. S, sans oublier mon chère mari Aissi Abdennour

On tient à remercier l'ensemble de la promotion qualite des produits et sécurité alimentaire 2018/2019.

On n'oubliera pas de citer les techniciennes du laboratoire de Microbiologie et particulièrement Mme Gahfif Wahiba et Mosaoui Sabrina et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sincèrement merci

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes frères DAOUED, FAOUAZ et HAROUN et mes soeurs MERIEM et HOUDA qui m'ont

soutenu tout au long de mon cursus.

À mon très cher mari AISSI ABDENNOUR et sa gentill famille ,Tes sacrifices, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

À toute ma famille MABREK et ZAIDI, ma belle famille, à ma binôme SIHAM, à mes amies FAIZA, KHADIDJA et ZAIDI ASMA et NADIA et toute la promotion 2019 de Qualité des produit et securite alimentaire.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

AICHA

DEDICACES

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste Travail.

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce mémoire de
Master*

A la lumière de ma vie ma mère : Allaoua Kaltoum, Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

*A mon très cher Père: Hadjadj Hamid, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour
mon éducation et mon bien être*

A mes frères : Noureddin, Mourad, Ilies

A mes sœurs : Salima, Hakima, Chaïma

Pour leurs encouragements et je leurs souhaite tout le bonheur et la réussite

A tous ceux qui me sont chers et proches et tous ma famille

A mon binôme : Mabrek Aïcha

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer

*A toutes mes chers ami (es) intimes et mes collègues de l'université de
Mohammed Elbachir Elibrahimi(BBA)*

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études à université. Que ce travail soit l'expression de ma grande affection et un témoignage de Mon attachement et de mon profond amour.

HADJIDJ SIHAM

RÉSUMÉ

Ce travail est porté sur l'identification biochimique des bactéries lactiques (lactobacille) à caractère probiotique présentent dans les produits de l'apiculture, et la mise en evidence de leur effet bactericides contre les bacteries pathogène.

Nous avons analysés 4 échantillons de propolis ,deux échantillons ont été prélevés par nos soin, de deux regions à BBA) , et les deux autres aquis au niveaux de commerce.

Le résultat de dénombrement à montre que une richesse bactérienne en nombre dans les échantillons frais par rapport au deux échantillons aquis au niveau du commerce.

nous avons isolés deux souches l'une du genre *lactobacille* et l'autre du genre *entérocoques*

, identifié par des tests biochimiques que nous avons réalisés, quant à l'effet de bactéricide des souches isolés vis à vis de souche pathogène qui *E. coli* . Nous avons conféré cette hypothèse avec une zone d'inhibition de 6 et 13mm pour chacun.

Mots-clés:

Propolis. Probiotique. *Lactobacillus*. Identification biochimique. effet antibactériens.

يركز هذا العمل على التحديد الكيميائي الحيوي لبكتيريا حمض اللبنيك (*Lactobacillus*) ذات الطبيعة بروبيوتيك الموجودة في منتجات تربية النحل ، وإظهار تأثيرها المبيد للجراثيم ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

لقد قمنا بتحليل 4 عينات من العكبر ، تم أخذ عينتين من اختيارنا ، من منطقتين ب برج بوعريريج (القصور و الحمادية) و عينتين مستوردتين (مصدر تجاري)

تُظهر نتيجة العد وجود ثراء بكتيري في العينات الطازجة مقارنة بالعينتين اللتين تم تناولهما على مستوى التجارة.

عزلنا سلالتين، واحدة من جنس *Lactobacillus* والأخرى من جنس المكورات المعوية، التي حددتها الاختبارات الكيميائية الحيوية التي أجريناها، فيما يتعلق بالتأثير البكتيري للسلاطات المنعزلة على السلالة الممرضة التي تسببها *E. coli*. لقد منحنا هذه الفرضية منطقة تثبيط 6 و 13 ملم لكل واحدة.

كلمات مفتاحية:

عكبر. بروبيوتيك. الملبنة. التعرف الكيميائي الحيوي. تأثير مضاد للجراثيم.

sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
CHAPITRE I : ABEILLE ET PROPOLIS	
1 -L'abeille	
1-1 Généralité	3
1-2 Classification	5
2 Propolis	
2-1 Historique	5
2-2 Définitions	6
2-3 Composition et propriétés chimiques	6

Figure N°	Titre	Page N°
Figure 01	morphologie générale de l'abeille	3
Figure 02	différentes sous espèces d'abeille <i>Apis mellifera</i>	4
Figure 03	différent composition chimique de propolis (apisudest.fr)	7
Figure 04	la récolte de propolis par l'abeille	10
Figure 05	méthode de grattage de propolis par l'homme	10
Figure 06	méthode de grille pour la récolte de la propolis	11
Figure 07	Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	13
Figure 08	les différents types de propolis prélevée	19
Figure 09	les étapes de préparation de l'échantillon pour la macération	20
Figure 10	filtration de mélange de propolis après macération	20
Figure 11	l'extrait hydro éthanolique de propolis	20
Figure 12	la méthode de condition d'anaérobiose	21
Figure 13	L'aspect macroscopique des colonies isolé à partir de propolis	27
Figure 14	Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram	27
Figure 15	Résultat de test pH =9.1	30
Figure 16	Résultat de test thermorésistant	31
Figure 17	Résultats de test d'antagonisme	31

Liste des tableaux:

Tableau N°	Titre	Page N°
Tableau 01	Les principaux genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques.	15-16
Tableau 02	Présentation des différents types d'échantillons de propolis à partir de différentes régions.	19
Tableau 03	Résultats de dénombrement des colonies UFC /g.	23
Tableau 04	Résultats des tests biochimiques.	28-29
Tableau 05	Résultats de test de croissance à des températures différentes.	30

sommaire

a) Saveur	6
b) Odeur	7
c) Couleur	7
2-4 Propriétés physiques	7
a) La consistance	7
b) La densité	7
c) Le point de fusion	7
d) La solubilité	8
2-5 Propriétés thérapeutiques de la propolis	8
a) Activité antioxydant	8
b) Activité anti-inflammatoire	8
c) Activité antimicrobienne	8
d) Activité cicatrisante	8
e) Activités anti cancéreuses	8
f) Activité antivirale	9

sommaire

2-6 Utilisation de propolis	9
a) Par les abeilles	9
b) Par l'Homme	9
2-7 Récolte de la propolis	9
a) Par les abeilles	9
b) Par l'homme	10
Chapitre 2: Les probiotique et les bactéries lactiques	
1 Les probiotiques	
1-1 Historique et définition	12
1-2 Les principaux micro-organismes probiotiques	12
1-3 Les effets bénéfiques des probiotique sur la santé	13
2 Les bactéries lactiques	
2-1 Historique	13
2-2 Définitions et description générale	14
2-3 Classification phylogénique	14

sommaire

2-4 Les principaux genres des bactéries lactiques	15
3 Le genre <i>Lactobacillus</i>	
3-1 Caractères biochimiques et physiologique	16
3-1-1 Les Lactobacilles homofermentaires stricts	16
3- 1-2 Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts	16
3-1-3 Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	17
3- 2 Caractères morphologiques et culturaux	17
Partie II : Partie pratique	
Chapitre1: Matériel et méthode	
1- Matériel	18
1-1 Plan d'échantillonnage	18
1-2 Mode de prélèvement	19
2- Méthodes	19
2-1 Préparation des extraits éthanolique de propolis	19
2-2 La préparation de la solution mère et les dilutions décimales	21

sommaire

2-3 Ensemencement et incubation	21
2-3-1- Préparation du milieu de culture	21
2-3-2-Ensemencement en surface	21
2-4 Isolements et dénombrement des bactéries lactique	22
2-5 Purification	22
• Conservation à court terme	22
• Conservation à longue durée	22
2-6 Identification des isolats	22
2-6-1 Aspect macroscopique	22
2-6-2 Aspect microscopique	22
2-6-3 Etude biochimiques	23
a) Test catalase	23
b) Test oxydase	23
c) Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron.)	23
d) Production de l'urée	24

sommaire

e) Test de l'indole	24
f) Test de Simmons	24
g) Test de fermentation de Glucose, Lactose et Fructose	24
2-6-4 Etudes physiologiques	24
a) Croissance a des différentes températures	24
b) Test de pH	25
2-6-5 Caractères technologique	25
a) Test de thermo résistance	25
b) Test d'antagonisme	25
• Préparation de culture de bactérie indicatrice	25
• Détection de l'activité antagoniste	25
Chapitre 2: Résultats et discussion	
1- Résultats	26
2- Discussion	32
Conclusion	

sommaire

Résumé	
Références	
Annexes	

Liste des abréviations:

Mots	Signification
ARN	Acide Ribo Nucléique
°C	Degré Celsius
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CO₂	Di oxyde de carbone
EEP	Extrait Ethanolique de propolis
E. coli	Escherichia coli
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Fer
Fig.	Figure
Fru	Fructose
Glu	Glucose
h	heure
H₂	Gaz d'hydrogène
H₂S	Sulfure d'hydrogène
Lac	Lactose
Lb	Lactobacille
min	Minute
mg	milligramme
Mg	Magnésium
ml	millilitre
MRS	Man, Rogosa, et charpe
NaOH	Hydroxyde de sodium
Ni	Nickel
OMS	Organisation Mondiale de Santé
OX	Disque d'oxydase
s	Second
S	Souche

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
Si	Silicium
T	Température
TSI	Triple Sugar Iron
Zn	Zinc
µg	Micro gramme
UFC/g	Unité formant colonie par gramme
%	Pourcentage
(-)	Négatif
(+)	Positif

INTRODUCTION

Introduction:

De tout temps, l'homme a utilisé les ressources naturelles pour survivre et évoluer dans son environnement. Il a ainsi appris au fil des millénaires à récolter dans un premier temps les produits que l'abeille et ses ruches pouvaient lui fournir, avant de domestiquer ce petit animal en inventant l'apiculture.

L'homme est ainsi entré dans une relation d'échanges avec l'abeille, entretenant les ruches, soignant leurs occupantes et obtenant en retour de ces services les précieux produits apicoles.

Ce n'est que récemment que l'intérêt pour les produits de la ruche s'est décuplé afin d'étayer avec des démarches scientifiques, les observations qui avaient alors été faites.

Cette démarche s'inscrit dans un contexte où les médecines dites « naturelles » ou « douces » sont de plus en plus recherchées par le grand public, en effet ce dernier est plus réticent face aux désagréments que peut causer le médicament chimique et par conséquent, il est plus ouvert aux alternatives que proposent des produits comme ceux qui sont issus de l'abeille et de la ruche. La propolis est 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.

L'importance de ces observations sur la propolis nous a incités à entreprendre des recherches sur les autres propriétés biologiques de ce produit apicole, encore peu étudié.

Nous sommes proposés d'étudier quelques échantillons de propolis provenant de 2 régions (ksour et elhamadia) et 2 échantillons commercialisés. Cette étude est réalisée afin de pouvoir isoler et identifier les bactéries lactiques dans la propolis.

INTRODUCTION

Notre memoire sera donc composé de deux parties, la première partie comporte deux chapitres, le premier chapitre sera consacré à une recherche bibliographique sur l'abeille et un profilée de l'histoire et la composition de la propolis, ainsi que son utilisation au cours des siècles et ses activités biologiques.

Le deuxième chapitre élucide les probiotiques et leurs effets bénéfiques ainsi qu'une recherche bien détaillée sur le genre *lactobacillus*.

La deuxième partie c'est la partie expérimentale qui contient deux chapitres le premier concerne le matériel et la méthode utilisé pour réaliser ce travail, le deuxième sera consacré à la présentation des résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion.

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

Depuis l'antiquité et encore largement répandue, L'homme cultive les produits de la ruche depuis l'antiquité. Le miel fait partie de ces choses goûteuses que la nature nous offre. Néanmoins, les produits de la ruche possèdent bien des propriétés thérapeutiques qui font de cette dernière une véritable pharmacie naturelle. Cela a donné naissance à l'apithérapie, une médecine alternative qui utilise exclusivement le miel, la gelée royale, la propolis mais aussi le venin pour soigner les malades. (Van Wittenberg, 2014).

1- l'abeille

1-1 Généralité sur l'abeille:

L'abeille, cet insecte social appartenant à l'ordre des hyménoptères, est à l'origine une guêpe ayant la capacité de stocker des provisions à base de pollen, de nectar ou de miellat. Les abeilles sont apparues il y'a plus de 45 millions d'années, elles se distinguent des guêpes par leur morphologie et leur comportement. Le corps de cet insecte est divisé en plusieurs ségments des quels trois parties sont facilement distinguables dont: tête, thorax et l'abdomen (Lakermi, 2018).

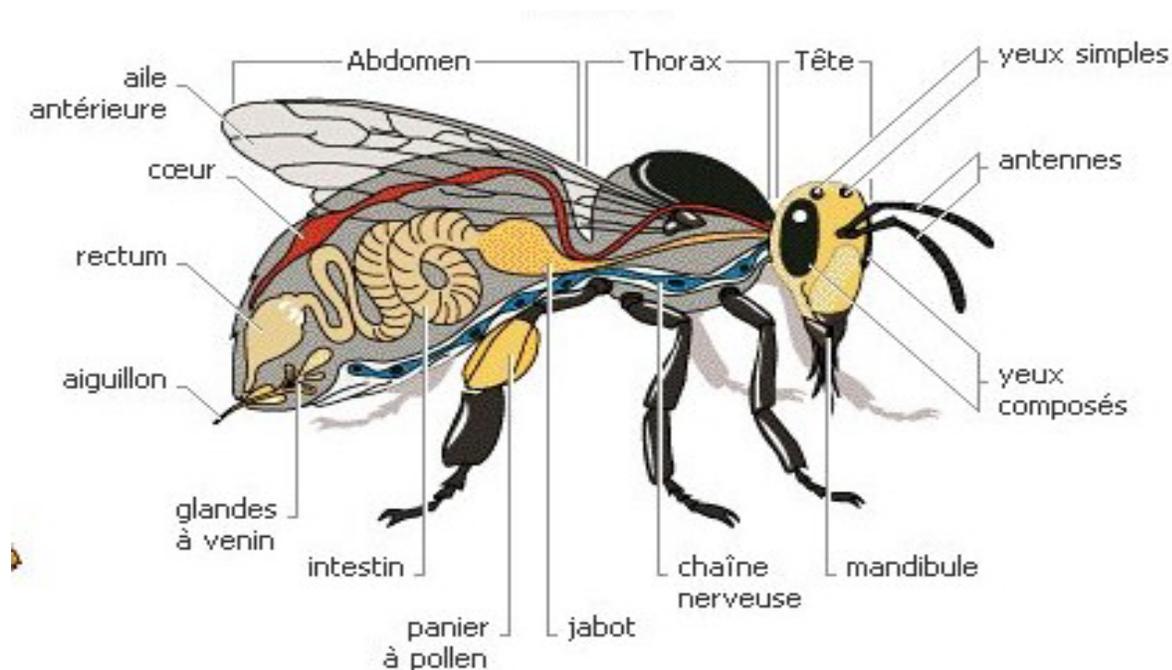


Figure 01: morphologie générale de l'abeille

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

L'espèce *Apis mellifera* comporte une vingtaine de races (ou sous-espèces) appartenant à des groupes correspondant à des aires géographiques (**Boucif, 2017**).

Par exemple, *Apis mellifera mellifera*, également appelée abeille noire ou commune, fait partie du groupe de Méditerranée occidentale. Il s'agit de l'abeille la plus exploitée pour l'apiculture en Afrique, France. Viennent ensuite l'abeille jaune ou italienne (*Apis mellifera ligustica*), la Caucasiennne (*Apis mellifera caucasica*), la Carnolienne (*Apis mellifera carnica*) et la Buckfast (issue du croisement de l'abeille commune et de l'abeille italienne) (**Boucif, 2017**).

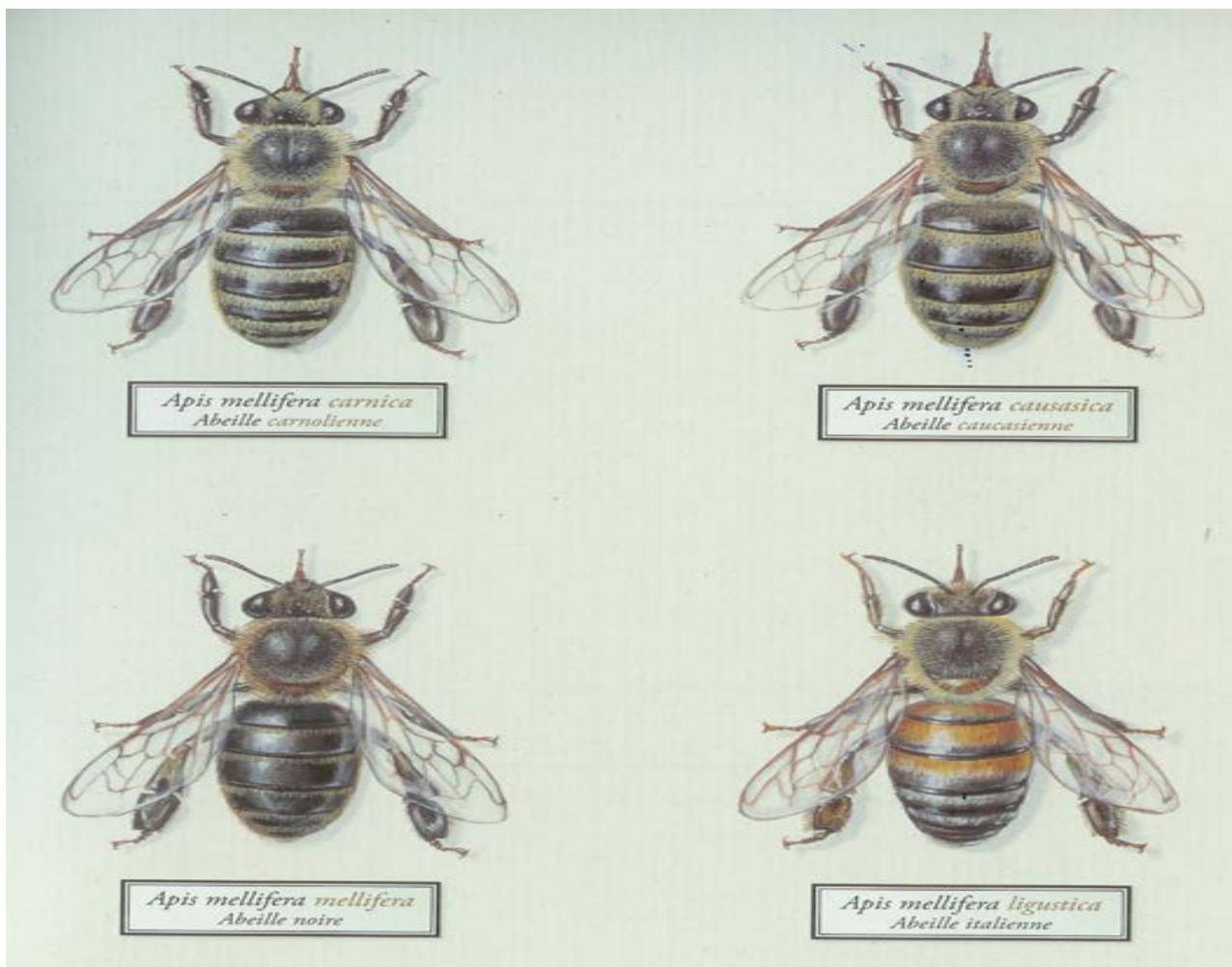


Figure 02 : différentes sous espèces d'abeille *Apis mllifera*

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

1-2 La classification des abeilles :

D'après **Ravazzi (2003)**, la classification des abeilles a évolué avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire. L'abeille domestique *Apis mellifera* est classée comme suit :

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Arthropoda*

Sous-embranchement : *Mandibulata*

Classe : *Hexapoda = Insecta*

Super Ordre : *Hymenopteroidea*

Ordre : *Hymenoptera (Hyménoptères)*

Sous Ordre : *Aculeata*

Genre : *Apis*

Espèce : *Apis mellifera*

2- La propolis

2-1 Historique :

Dès l'Antiquité, la propolis était employée comme moyen thérapeutique contre les affections de la peau, les plaies et les suppurations.

En (3200 à -1100 ans av JC), La propolis avait un rôle religieux dans l'Égypte ancienne ils utilisaient cette résine pour embaumer les morts (momification).

Les Grecs (700 à -600 ans av JC), ont observé que cette substance résineuse se situait à l'entrée de la ruche comme barrière de protection contre les prédateurs.

En Amérique du Sud, les Incas utilisaient la propolis comme antiseptique. Hippocrate recommandait la propolis pour la guérison des plaies et des ulcères.

Les Arabes connaissaient aussi la propolis. Avicenne a parlé de deux sortes de cire: la cire propre et la cire noire, cette dernière étant probablement la propolis.

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

Il a dit: «par sa forte odeur, elle fait éternuer...» et «Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement» (Soltani, 2017)

2-2 Définition:

Etymologiquement, le mot « propolis » est d'origine grecque et il signifie « pro = en avant » et « polis = cité » qui signifie « devant la cité ». La propolis est une substance jaunâtre mastic butinée par les abeilles ouvrières (*Apis mellifera*), à partir des résines, des cires, et des baumes végétaux récoltés sur les bourgeons des plantes et des arbres, qu'elles mélangent à des sécrétions digestives et à leur propre cire. Ce dernier est utilisé comme barrière de défense puissante contre le développement des microorganismes (bactéries, virus et moisissures) à l'intérieur de la ruche (Renneberg et al., 2017.; Bankova et al., 2000).

2-3 Composition et propriétés chimiques :

La composition de la propolis se diffère significativement selon l'origine botanique et géographique. Elle dépend des conditions climatiques, du terrain, et de la disponibilité de l'eau et d'autres facteurs environnementaux. L'origine botanique et les modifications issues des sécrétions hypo pharyngiennes des abeilles (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone) sont les deux facteurs responsables les plus importants de sa composition, la figure suivante montre les différents composants de propolis (Pascoal et al, 2014).

Les composants les plus intéressants sont les flavonoïdes et les acides aromatiques tels que l'acide benzoïque (benjoin), l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide caféique et surtout leur ester, ainsi que des quelques vitamines (A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, C, E), et quelques sels minéraux : Mg, Fe, Zn, Ni, Si sous forme organique donc assimilables (Françoise, 2012).

Les propriétés chimiques sont très variables et dépendent de la faune botanique et l'origine géographique.

a) La saveur :

Elle est de saveur acre, piquante, parfois amère, qui donne une insensibilité de la muqueuse buccale (Sauvager, 2014).

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

b) L'odeur :

Elle a une odeur variable selon son origine, en générale, arôme agréable douceâtre, mélangé à celui de miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc....) (Metzner et al., 1997).

c) La couleur :

Elle a de couleur très variable selon sa provenance (botanique et géographique), allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrême riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.) (Sauvager, 2014).

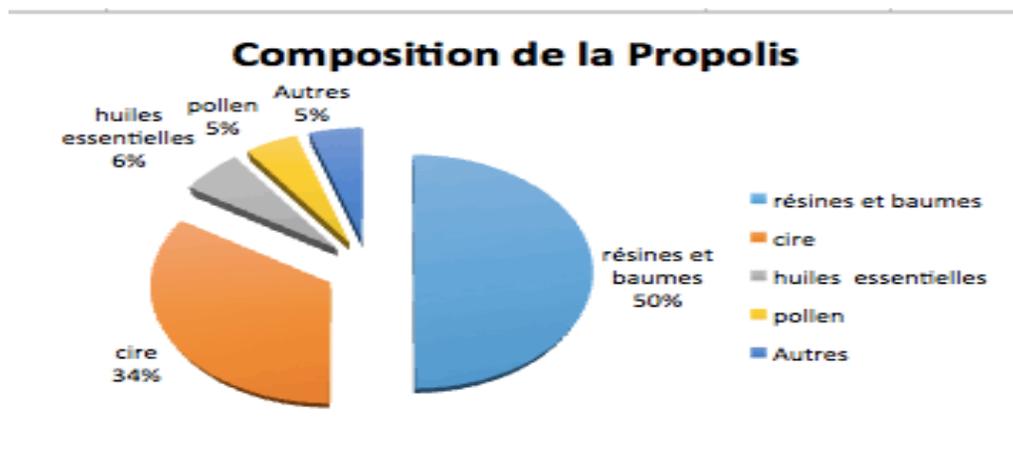


Figure03:les composants chimiques de propolis (apisudest.fr)

2-4 propriétés physiques de la propolis :

a) 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, et entre 30°C et 60°C elle est coulante et gluante (Krell, 1996).

b) La densité :

La densité de la propolis est de l'ordre de 1,11 à 1,14 (Rebai, 2017).

c) Le point de fusion :

Le point de fusion se situe vers 60 à 70°C en moyenne mais peut atteindre 100°C et plus (Athmani et al, 2018).

d) La solubilité :

La propolis d'abeille est peu soluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'acétone, l'éther, le chloroforme, le benzène,...etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (**Belhadi et Yessad, 2016**).

2-5 Propriétés thérapeutiques de la propolis :

a) Activité antioxydant :

La richesse de la propolis en flavonoïdes lui confère une propriété à piéger les radicaux libres, elle possède aussi d'autres composants responsables du pouvoir antioxydants comme l'acide caféique, l'acide caféoylquinique, l'acide cinnamique, et leurs dérivés, ainsi que la drupanine (**Cousin, 2014**).

b) activité anti-inflammatoire :

La propolis est un bon anti-inflammatoire jouant un rôle dans la stimulation des processus anti-inflammatoires, par la stimulation des macrophages, et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, ainsi que l'inhibition de la synthèse des eicosanoïdes. Les principales molécules actives de la propolis sont les acides phénoliques (**Cardoso et al., 2011 ; Valente et al., 2011**).

c) Activité antimicrobienne :

In vitro, la propolis peut agir directement sur les micro-organismes, et in vivo elle peut stimuler les systèmes immunitaire en activant le mécanisme implique dans la lutte de ces micro-organismes. En effet, c'est grâce à son activité antimicrobienne très intense que la propolis est connue sous le nom "d'Antibiotique naturel " (**Donadieu, 2008**)

d) Activité cicatrisante :

Les acides phénoliques et certains acides aminés sont des acteurs incontestables de la cicatrisation et de la régénération des cellules (**Gharbi, 2011**).

e) Activités anti cancéreuses :

La propolis fait l'objet d'études pour le traitement des cellules cancéreuses elle a un effet cytotoxique qui permet d'inhiber les cellules tumorales Hela avec une CMI50 de 7.5µg/ml (**Ghedira et Goetz, 2009; Banskota, 2002**).

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

f) activité antivirale :

Selon des études menées par **Schnizler et al. (2010)** ont montré que la propolis et ses constituants étaient efficaces contre nombreux virus : virus Herpes (bouton de fièvre), virus des hépatites (HBV, HCV), virus de la grippe, virus des gastroentérites (entérovirus, rota virus).

2-4 Utilisation de propolis :

a) Par les abeilles :

Les abeilles se servent de la propolis pour tapisser l'intérieur de leur ruche afin de la renforcer et de le calorifuger, elles optimisent également la régulation du microclimat dans la ruche, en réduisant l'entrée de la ruche. La propolis sert également à embaumer les cadavres des intrus, colmater les fissures de la ruche, fixer les cadres et consolider les cellules (**Biri, 2002**).

b) Par l'Homme :

Elle est utilisée comme un puissant antibiotique naturel pour prévenir certaines maladies telles que les maladies hivernales, la grippe et l'angine, ainsi que certaines infections respiratoires. Elle est aussi reconnue pour renforcer l'immunité. (**Sattler et al., 2015**).

2-5 Récolte de la propolis :

a) par les abeilles :

Pour la production de la propolis, les espèces *Apis mellifera* en particulier les ouvrières butineuse collectent des résines et des exsudats à partir de plantes (**Rebai et Saidi, 2017**). Au cours de la collecte, l'abeille sécrète des enzymes qui s'appellent «Béta glucosides », sécrétée par les glandes hypo pharyngiennes qui hydrolysent des composés phénoliques tels que les flavonoïdes hétérosides qui seront transformés en flavonoïdes aglycones et en sucres (**Baghdad, 2017**).

Durant le retour à la ruche, la résine récoltée est partiellement métabolisée par l'abeille, par l'ajout de sa salive .La butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières, soit au trou de la ruche, soit le plus souvent à l'endroit même où la substance est utilisée (**Rebai et Saidi, 2017**).

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS



Figure 04 : la récolte de propolis par l'abeille <http://www.aloemagazine.com/propolis-abeille/>

b) **par l'homme** : La propolis peut être récoltée selon deux méthodes :

- **La méthode classique :**

La récolte se fait de préférence par grattage des cadres ou des parois de la ruche à température assez basse car la propolis, alors est dure et friable, se détache mieux. **(Krell, 1996).**



Figure 05 : méthode de grattage de propolis par l'homme

<http://www.lesruchersdargonne.com/Propolis.htm>

- **Le système de grille :**

L'utilisation des grilles spécifiques qui se placent sur la tête des cadres sans isolant par-dessus peut améliorer la qualité du produit. Cette utilisation de grilles en bois, en plastique souple moulé ou en métal inoxydable permet une récolte ponctuelle durant les périodes de grande production et en dehors des périodes de traitement des ruches **(Nader Elhousseini, 2013).**

CHAPITRE 1: LA PROPOLIS

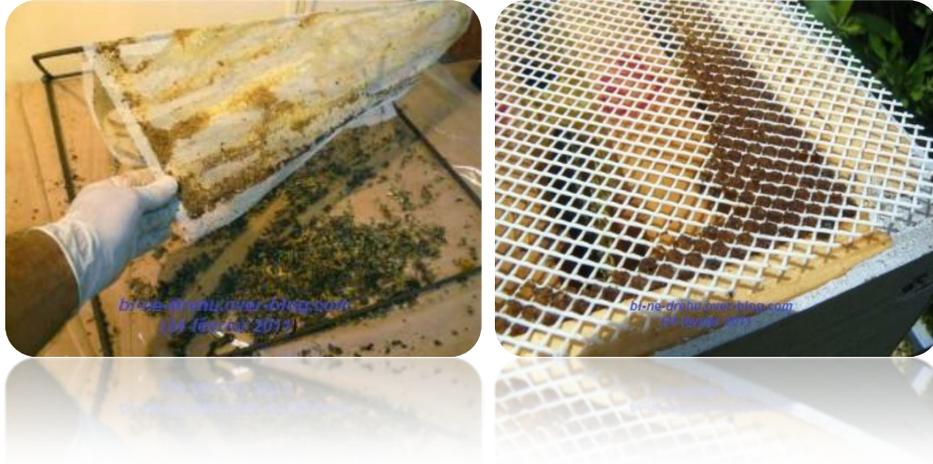


Figure06 : méthode de grille pour la récolte de la propolis

<http://blog.exometeofraiture.net/blog/2016/10/23/apiculture-propolis/>

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

Depuis l'antiquité, les hommes consomment des aliments fermentés, dont on sait maintenant que les effets bénéfiques sont en partie dus aux micro-organismes probiotiques.

Des récents travaux scientifiques sur les propriétés et la fonctionnalité des micro-organismes dans les aliments donnent à penser que les probiotiques jouent un rôle important dans les fonctions immunologiques, digestives et respiratoires et qu'ils sont susceptibles d'aider à lutter contre les maladies infectieuses chez les enfants et d'autres groupes à risque élevé. (FAO, 2006).

1- Les probiotiques :

1-1 Historique et définition :

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel) émet l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de certaines populations de l'Europe de l'est seraient dues à leur consommation quotidienne de laits fermentés (Sanders., 2000). Par la suite, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte, et ce fut Parker qui proposa pour la première fois en 1974 le terme « probiotique » pour désigner les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Vasiljevic et Shah, 2008).

Plus tard, Fuller (1991) a redéfini les probiotiques de la façon suivante : « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale » et depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Millette et al, 2008). Actuellement, la définition la plus utilisée a été validée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) et qui ont défini les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Salminen et al., 1998; FAO/OMS, 2001).

1-2 Les principaux micro-organismes probiotiques :

Un probiotique appartient à la flore commensale transitoire, il ne doit pas être pathogène ou carcinogène, il doit survivre dans l'aliment et le tractus intestinal. Parmi les microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme, les bactéries lactiques, hôtes naturels de la microflore intestinale de l'Homme (microbiote), sont souvent retrouvés. Les probiotiques les plus étudiés appartiennent aux genres : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Saccharomyces*. (Millette et al, 2008).

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

1-3 Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé :

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 la figure suivante. 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).

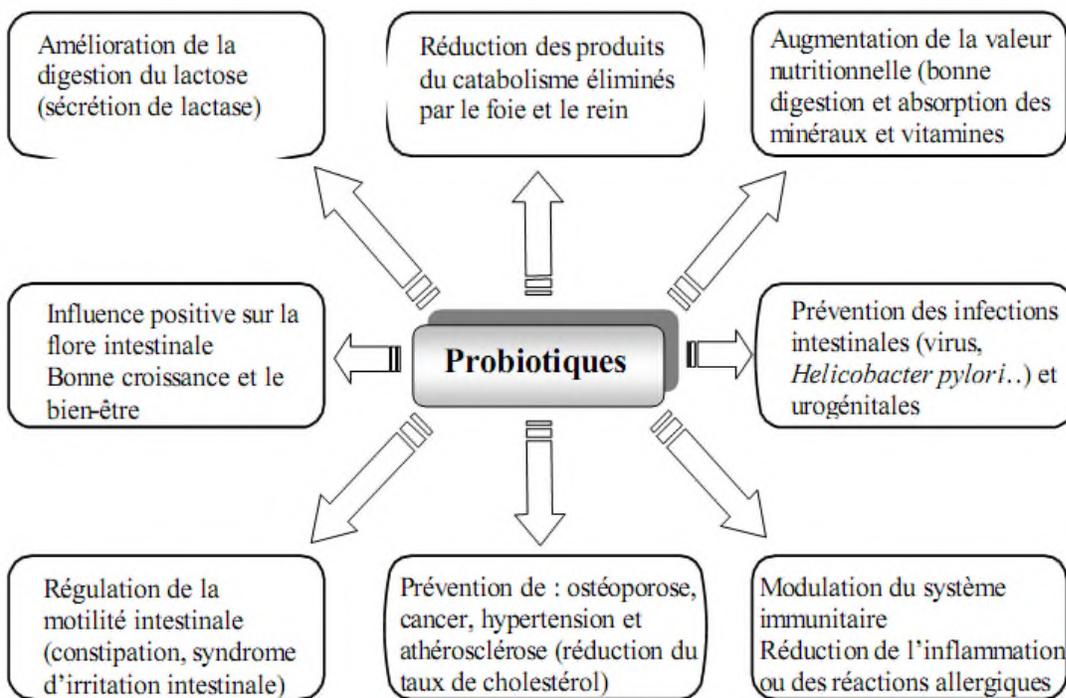


Fig07 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Amrouche, 2005).

1 Les bactéries lactiques :

2-1 Historique :

Depuis plus de 4000 ans l'homme a utilisé les bactéries lactiques pour la fermentation des aliments, sans autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité organoleptique (Sallofe Coste, 1994). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, en particulier en 1897, le chercheur Von Freudenreich a isolé un *Streptococcus* sp (Poulain, 1994).

Au début du 20^{ème} siècle la production des cultures de bactéries et l'emploi de ferment se développent (Dridier et Prevost, 2009).

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

2-2 définitions et description générale :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimiotrophes (**Zergoug, 2017**). Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (*Streptococcus* et *Lactococcus...*), en bâtonnets (*Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc*) (**Luquetf et Corrieu, 2005; Galvez et al., 2011**).

Ce sont des bactéries ubiquistes, sont retrouvées dans différentes niches écologiques, et peuvent être isolées de certains aliments tel que le lait et le fromage (**Mayo et al., 2010**).

Ce groupe de bactéries a été défini par Orla-Jensen (1919) comme des bactéries caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique comme métabolite final (**Doan, 2011**), et considérées comme non pathogènes, à l'exception de certains genres lactiques sont considérés comme pathogènes opportunistes (**Leonard, 2013**). Ce groupe réunit plusieurs genres Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram(+), oxydase (-), catalase (-), généralement nitrate réductase (-), elles sont micro aérophiles (**Joubert, 2016**), elles sont capables de réaliser la fermentation en aéro-anaérobiose (**Leveau et Bouix ,1993 ; de Roissart et Luquet, 1994**).

2-3 Classification phylogénique :

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques ont un pourcentage de G+C% inférieur à 55% (**Federighi et al., 2005**). Selon le Bergey's manuel de la taxonomie (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* et ordre des *Lactobacillales* et renferment trente-cinq genres. Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparates. (**De Vos et al., 2009**).

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

2-4 Les principaux genres des bactéries lactiques :

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent 11 genres bactériens différents

Tableau 01 : Les principaux genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (**Federighi et al, 2005**).

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques principal	Habitat principal
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou Mésophiles	Homme, Produits laitiers, carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychotrophes, peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles, croissance à 10°C et non à 45°C	Produit laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Thermophiles	Produit laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles, croissance à 45°C et non à 10°C, thermo résistance	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles, Halotolérants	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles, Halophiles	Saumures

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Aerococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers

2 Le genre *Lactobacillus* :

Ce genre aujourd'hui regroupe plus de 150 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de lactobacilles présentent une morphologie en bâtonnet (bacilles) long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles (**Mattarelli et al., 2014**). Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche) (**De Vos et al., 2009**). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (**Axelsson, 1993**).

ORLA- JENSEN (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres :

***Thermobacterium, Bêtabacterium, Streptobacterium* .**

3-1 Caractères biochimiques et physiologiques :

Nous avons trois types de bactéries :

- a) **Les lactobacilles homofermentaires stricts (*Thermobacterium*)** : Comprend des Lb homofermentaires thermophiles, se développant à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) qui dégradent les hexoses en acide lactique sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

CHAPITRE 2: PROBIOTIQUES ET BACTÉRIES LACTIQUES

- b) **Les lactobacilles hétérofermentaires stricts** (*Bêtabacterium*) : regroupent les Lb qui fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentaire de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. Le sous-groupe comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco* (**Boullouf, 2016**).
- c) **Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** (*Streptobacterium*) : Rassemblant les Lb qui métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire mésophile d'Emden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (**Kandler et Weiss, 1986 ; Stiles et Holzappel, 1997**).

L'arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (**Schleifer et Ludwig, 1995**).

3-2 Caractères morphologiques et culturels :

Les Lb sont des bactéries asporulées, en forme bacille souvent allongées, regroupées en paires ou en chaînes (**Laprent, 2000 ; Guiraud et Rosec, 2004**). Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *Lb. Plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres. Ils sont anaérobies facultatifs, mais poussent mieux sous atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO₂ (**Laprent, 2000**), leur pH optimum de croissance est de 5,5 mais ils poussent aussi à pH neutre contrairement à *Carnobacterium*. Leur température optimale de croissance est généralement comprise entre 30 et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces. Néanmoins, une culture peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C chez certaines espèces. Le caractère Gram positif peut être perdu dans les cultures âgées. La longueur des cellules peut varier à l'extrême, allant des formes longues jusqu'aux formes coccoides. Cette particularité rend parfois difficile la distinction entre les Lb hétérofermentaires et les *Leuconostoc* (**Euzèby, 2006**).

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

Lieu de travail et objectif :

L'étude à été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie 14 faculté ST de l'université Mohammed El Bachir Elibrahimi BBA, durant la période, du mois de décembre jusqu'au mois de Mai 2019.

Cette étude à pour objectif d'isoler et identifier des bactéries lactique à caractère probiotique (lactobacilles), et pour détecter leurs activités anti bactérienne vis-à-vis d'une souche pathogène (*E. coli*) à partir d'extrait éthanolique de propolis.

1 Matériels

Pour réaliser ce travail nous avons utilisés les matériels et les équipements du laboratoire voir l'annexe 01.

Matériels biologique :

Des échantillons de propolis et leur extrait éthanolique(EEP) que nous avons préparés
Une souche d'*E. coli* (non références).

Les milieux de culture utilisée :

- MRS.
- Gélose nutritif.
- Mueller Hinton
- l'eau physiologie 0,9%.
- L'eau peptoné (Annex02)

1-1 Plan d'échantillonnage :

L'isolement des souches a été effectué à partir de différents types d'échantillons de propolis répartie comme suit: deux échantillons à partir du commerce sous forme de poudre et deux échantillons frais sous forme de résine prélèvent par nos soins chez des apiculteurs dans la région de Ksour et Elhamadia à Bordj Bou Arreridj (figure 8), nos échantillons sont collectés selon les règles d'hygiène et d'asepsie, et nous avons conservés au réfrigérateur à 4°C.

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:



Figure 8: les différents types de propolis prélevée.

Tableau 2 : présentation des différents types d'échantillons de propolis à partir de différents régions.

N° d'échantillons	Type d'échantillons	Lieu
Echantillon 01	Frais	Ksour (Bordj Bou Arreridj)
Echantillon 02	Frais	Elhamadia (Bordj Bou Arreridj)
Echantillon 03	Commercialisé (importé d'Espagne)	Bordj Bou Arreridj
Echantillon 04	Commercialisé	Bordj Bou Arreridj

1-2 Mode de prélèvement :

Les deux échantillons qui nous ont été fournis par des apiculteurs de chaque région ont été prélevés par la méthode de raclage à l'aide d'un grattoir stérile, et nous avons grattés les cadres de la ruche, les deux échantillons sont conservés dans des récipients en verre hermétiquement fermés à T° ambiante.

2 Méthodes

2-1 Préparation des extraits éthanolique de propolis :

Les extraits de propolis ont été préparés selon le protocole de **Yang et al. (2011)** qui contient plusieurs étapes :

- Nous avons découpés la propolis brute en petit morceaux, dans le but d'augmenter la surface de contact avec le solvant d'extraction (éthanol).

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

- Nous les avons broyés avant d'extraire les principales substances bioactives de la propolis .l'extraction est réalisée par macération avec l'éthanol 70% (v/v) (dans les proportions propolis brute/solvant = 1/10 : P/V).
- Près d'un bec benzène, et dans une zone stérile nous avons désinfectés tous les matériels nécessaires pour l'extraction.
- Par une balance de précision, nous avons pesés 10g de propolis de chaque échantillon, ensuite nous avons mis chaque échantillon dans un erlenmeyer étiquetée (Fig.9), puis nous avons ajoutés 100ml de l'éthanol 70% pour chaque erlenmeyer.

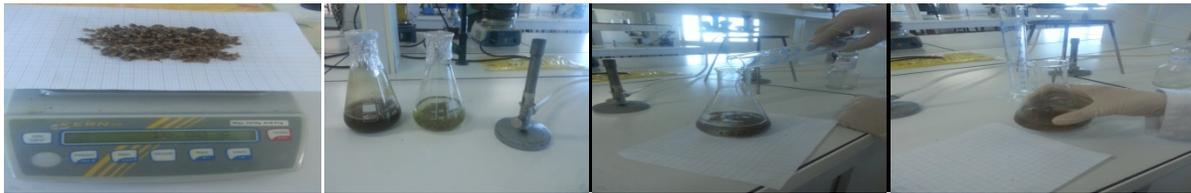


Fig.9: les étapes de préparation de l'échantillon pour la macération

- Le mélange est laissé pour macération pendant une semaine avec une agitation de temps en temps. (chaque 2 jour)
- Après macération, le mélange est chauffé au bain marie à 70°C pendant 30 min, par la suite on a filtré par le papier Wattman01 (Fig.10).



Fig.10 : filtration de mélange de propolis après macération

- L'extrait obtenu est appelé extrait hydro éthanolique de propolis (fig.11)



Fig. 11 : l'extrait hydro éthanolique de propolis

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

- Ensuite, ces solutions ont été concentrées à 40°C dans une Rotavapor.
- Après l'évaporation, les extraits ont été conservés dans des boîtes de pétrie en verre stérile à l'obscurité au réfrigérateur jusqu'à l'utilisation à T 4°C.

2-2 La préparation de la solution mère et les dilutions décimales :

Près d'un bec benzène, pour chaque extrait éthanolique de propolis (EEP) par l'utilisation de micropipette stérile, nous avons porté 1ml de l'extrait, que nous avons versés dans des tubes à essai stérile qui contiennent 9ml de bouillon MRS chaqu'un, pour but d'enrichissement, et nous avons mis dans l'étuve à 30°C pendant 24h, puis à partir de ce culture nous avons prélevés aseptiquement 1ml de chacune tube que nous avons versés dans des tubes à essai contenant chacun 9ml de l'eau physiologie stérile (Annexe 2), donc la culture obtenue représente la dilution $(10)^{-2}$. Par la suite une série de dilutions est effectuée jusqu'à la dilution $(10)^{-4}$.

2-3 Ensemencement et incubation :

a) **Préparation du milieu de culture** : Le milieu de culture utilisé pour l'isolement du lactobacille: C'est la gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) (Annexe 2). C'est un milieu sélectif utilisé pour les produits laitiers et les autres produits alimentaires. (**Bahfir et Belguidoum, 2017**).

2-3.1 Ensemencement en surface :

Dans une zone stérile près d'un bec benzène, nous avons versés dans chaque boîte de pétri 15 ml de gélose MRS et laisser solidifier. Puis on a introduit dans chaque boîtes Pétri stérile 1 ml d'extrait éthanolique à partir de chaque dilution décimal, puis nous avons procédés à un étalement sur gélose MRS, à raison de deux boites par dilution puis incubation en condition d'anaérobiose (Fig. 12) pendant 48h jusqu'à 72h à 37°C (**Battah et Bouhamdani, 2017**).



Fig. 12 : la méthode de condition d'anaérobiose

2-4 Isolements et dénombrement des bactéries lactiques :

Après la durée d'incubation nous avons procédés une lecture des boîtes incubée, ensuite nous avons réalisés un comptage des colonies pour chaque boite sous un compteur des colonies bactériennes.

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

2-5 Purification :

La purification des souches isolées a été réalisée par des repiquages successifs sur gélose MRS par la méthode des stries, l'incubation a été réalisée à 30°C pendant 48h.

Les repiquages sont effectués pour purifier les souches et des colorations de Gram sont réalisées afin de vérifier leurs puretés. Les souches considérées comme pures et qui possèdent les caractéristiques morphologique des lactobacilles (petite colonies blanchâtres, Gram +, forme bacilles) sont retenus et conservées pour des études macroscopiques et microscopiques ultérieurs (coloration de Gram, catalase).

- **La conservation à court terme:**

La conservation des bactéries a été réalisée dans des tubes de gélose MRS inclinée.

Après incubation à 30 °C ou 37 °C selon leur température optimale de croissance pendant 48h, les tubes sont conservés à +4 °C (2 semaine à un mois) (**Bennai et Temine, 2017**)

- **Conservation à longue durée :**

Le milieu de conservation contient 70% de la souche incubé à 37°C pendant 48h et 30% du glycérol (**Boumediene, 2013**). On a incubé la souche dans un tube à 37°C pendant 48h. Après l'incubation on a ajouté 2 gouttes de glycérol stérile. On a conservé les tubes dans le congélateur à T 0°C (3 mois).

2-6 Identification des isolats :

2-6.1 Aspect macroscopique :

C'est l'observation visuelle des colonies sur la surface de milieu MRS solide, pour caractériser leurs formes, leurs tailles leurs contours et leurs couleurs (**Hennine et Serière, 2017**).

2-6.2 Aspect microscopique :

L'aspect microscopique est révélé par la coloration de Gram qui a pour but de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif et d'observer la forme et le mode de regroupement.(annexe 3)

Pour l'observation microscopique (grossissement X 1000), on ajoute une goutte d'huile d'immersion (**Mami, 2007**).

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

2-6.3 Etude biochimiques :

a) Test catalase :

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en déposant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée (**Soltani, 2017**).

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries.

b) Test oxydase :

La recherche de cette enzyme consiste à déposer dans un tube à hémolyse, un disque « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, prélever une partie de la colonie à étudier, et l'étaler sur le disque. Après environ 10 minutes une coloration violet foncé apparaît sur le disque donc le test oxydase + (**Hennie et Serière, 2017**).

c) Test du milieu TSI (Triple Sugar Iron.) :

Pour mettre en évidence la fermentation des trois sucres (lactose, glucose et saccharose). nous avons procédé à l'ensemencement du culot par piqûre profonde et incubé à 30°C pendant 24h (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

- Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- Une coloration jaune du culot montre un glucose positif.
- Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz (bulles dans la gélose) pente par une strie médiane (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

d) Production de l'urée :

La mise en évidence de l'uréase s'est faite en utilisant le milieu urée-indole. Ce dernier est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans l'eau physiologique. On a incubé à 30°C pendant 24h (**Meziani, 2012**).

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

e) Test de l'indole :

Le test est réalisé en introduisant dans l'eau peptoné exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 18 h à l'étuve à T 37°C, l'addition du réactif de Kovac montre la production de l'indole qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu (**Meziani, 2012**).

f) Test de Simmons :

Ce test permet la mise en évidence du citrate perméase : enzyme permettant la souche l'utilisation du citrate comme seule source de carbone ; après incubation à 37°C pendant 24h, l'utilisation du citrate se traduit par la libération des ions « OH⁻ », qui alcalinisent le milieu en se traduisant par une couleur bleue après le virage du vert de bromothymol (**Bey, 2009**).

g) Test de fermentation de Glu, Lac et Fru :

La préparation de ces solutions sucrées se fait par la pesée 5g de chaque sucre que l'on verse dans un erlenmeyer, puis on ajoute 100ml de l'eau peptoné (annexe 2) dans chaque erlenmeyer, puis mis en agitation douce jusqu'à l'obtention des solutions sucrées homogènes.

Nous avons distribués dans chaque milieu dans les tubes à essai, ensuite on les a autoclavés et on a ajouté 1ml de solution de rouge de crésol. Donc on obtient 10 tubes, une colonie de chaque souche estensemencée dans ces tubes, puis on incube des milieux à 30°C pendant 24h. Le développement de la culture et le virage au jaune de l'indicateur coloré (rouge de crésol) et l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre (**Boudjaibe, 2013**).

2-6.4 Etudes physiologiques :

a) Croissance à des différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles à des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation de bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 48h aux températures 30°C, 37°C et 45°C. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 30°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (**Bouricha, 2018**).

b) Test de pH :

Une série de quatre milieux d'essais a été réalisée sur les deux milieux MRS avec un pH de 9,1 comparativement avec une autre série qui a été réalisée sur les deux milieux MRS à pH 5,9 avec incubation à 37 °C pendant 24h (**Boudjaibe, 2013**).

CHAPITRE 01: MATÉRIELS ET MÉTHODES:

2-6.5 Caractères technologiques :

a) Test de thermo résistance :

Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées, puis les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 10min, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Boudjaibe, 2013**).

b) Test d'antagonisme :

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des précultures des souches à tester et la préculture de la souche indicatrice (pathogène).

• Préparation de culture de bactérie indicatrice :

Nous avons procurés une souche conservée de bactérie *E. coli* à partir de labo microbiologie SNV. A partir de cette souche on a préparé une série de dilution jusqu'au la dilution 10^{-4} . La recherche d'*E. coli* a été fait sur gélose nutritive (GN) .A l'aide d'une micropipette, on a porté 0,1ml à partir les dilutions. L'ensemencement a été effectué en surface en utilisant un râteau, l'incubation a été réalisée à 30C° pendant 72 heures (**Nahdi, 2016**).

• Détection de l'activité antagoniste :

Nous avons collé un volume 15 ml du milieu Mueller-Hinton gélosé dans des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sont ensemencées en surface par la suspension de la souche cible *E. coli* à l'aide d'un écouvillon. Ensuite on a déposé les disques que nous avons prélevés a partir de la culture de bactérie lactique sur le milieu de culture, la diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé se produit durant une incubation des boites à 37°C pendant 24 h. L'activité se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques. Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques seront mesurés. Ce test est répété trois fois pour la souche indicatrice (**Mebrek, 2019**). Le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats :

1-1 Résultats de dénombrement :

Après les trois jours d'incubation de nos souches bactériennes, nous avons obtenue les résultats de dénombrement suivants:

Tableau 03 : Résultats de dénombrement des colonies par UFC/g.

dilutions Echantillons	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Echantillon 01	3.10^2	$2,7.10^2$	$2,4.10^2$
Echantillon 02	$1,74.10^2$	$6,5.10^1$	(-)
Echantillon 03	$1,10.10^2$	$4,5.10^1$	(-)
Echantillon 04	(-)	(-)	(-)

(-):pas de croissance

Selon les résultats de dénombrement des bactéries lactiques dans les échantillons de propolis, que nous avons analysés, nous avons remarqués qu'il y a une différence de dénombrement entre les différents échantillons, notamment l'échantillon 01(3.10^2 UFC/g), par contre il y a absence de croissance bactérienne concernant l'échantillon 04 cela est du probablement à l'origine des échantillons, la richesse et la diversité de la végétation.

1-2 Identification des isolats :

La purification des souches lactiques isolée par plusieurs repiquages successifs sur milieux MRS, a permis d'obtenir deux isolats purs de bactéries lactiques dont une souche bacilles et autre souche sous forme de cocci. Ces derniers isolats ont été retenus pour la suite de l'étude.

1-2.1 Aspect macroscopique :

Selon **Laprent 2000**, les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Dans les cas rares, certaines espèces comme *Lb. Plantarum* donnent des colonies jaunâtres ou rougeâtres.

D'après les cultures obtenues par isolement sur milieu MRS qui sont observées à l'œil nu.

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

Les colonies paraissent sous forme de petites taille d'environ 1mm de diamètre, lisses, plus au moins blanchâtres, crémeuses, à bord arrondi et bombé (S02). Ainsi que des colonies volumineuses, bombés de couleur jaune clair (S01). Cependant ces deux souches sont considérées comme des souches pures que nous avons obtenues après plusieurs repiquages de l'échantillon (Fig. 13).

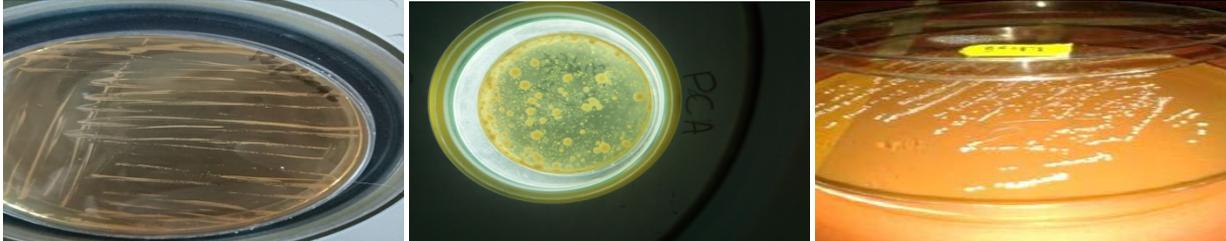


Fig. 13 : L'aspect macroscopique des colonies isolé à partir de propolis

1-2.2 Aspect microscopique :

D'après la coloration de Gram que nous avons réalisés, l'aspect microscopique des souches testées a révélé qu'il y a deux formes de cellules : de formes bâtonnets en paires et en chaînettes, et forme sphérique en grand nombre (coccobacilles) regroupé en amas, par fois en paires).

Les deux souches isolées étaient à Gram positif (Fig.14) .donc notre étude est orienté à l'échelle juste.

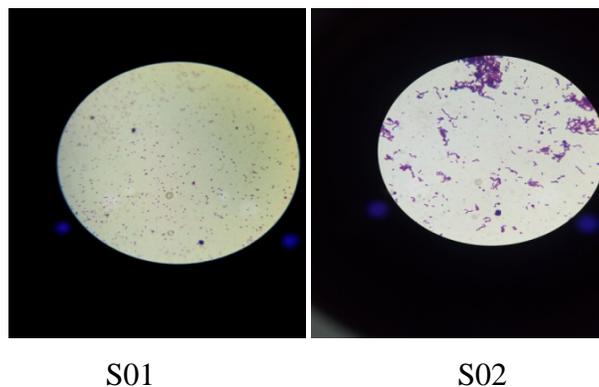


Fig. 14 : Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram

1-3 Résultats des testes biochimiques :

L'identification des espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques classiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH est la meilleure

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (**Bahfir et Belguidoum, 2017**). Mais puisque nous n'avons pas la capacité de s'acquérir à cette galerie, nous avons utilisés des tests biochimiques classiques :

Tableau 04 : les résultats des testes biochimiques.

Souche Test	S01	S02
Catalase	(+)	(-)
Oxydase	(-)	(-)
TSI	(+)	(+)
Fermentation de Glu	(+)	(+)
Fermentation de Lac	(+)	(+)
Fermentation de Fru	(-)	(+)
Production de gaz	(-)	(-)
Production H₂S	(-)	(-)
Citrate de Simmons	(-)	(-)
Production de l'urée	(-)	(-)
Indole	(-)	(-)

1-4 Résultat des tests physiologiques :

1-4.1 Test de croissance à différentes températures :

Selon **Collins et al., 2009** : la température optimale de croissance est généralement comprise entre 30et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces. Néanmoins, une culture peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C chez certaines espèces.

Dans notre étude, après la durée d'incubation à des différentes températures, on obtient les résultats suivants qui représentent sous forme de tableau :

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 05 : Résultats de test de croissance à des températures différentes

Les souches	T= 30°C	T = 37°C	T = 45°C
S01	+	+	+
S02	+	+	-

(+) : Présence de trouble

(-) : Absence de trouble

D'après les résultats nous remarquons que la « S01 » est thermophile par contre la « S02 » est mésophile.

1-4.2 Test pH :

Après la préparation d'un bouillon MRS nous avons ajustés le pH à 9.1 par l'addition de solution de NaOH, ensuite on aensemencé par une colonie de chaque souche, puis incubé à 30°C pendant 24h, après l'incubation on a observé que les deux tubes de bouillon sont troubles, donc les deux souches sont résistantes à pH =9.1 (Fig.15).



Fig.15 : Résultat de test pH =9,1.

1-5 Résultats des tests technologiques :

1-5.1 Test de thermo résistance :

Après l'incubation pendant 24h à 37°C des tubes de bouillon MRSensemencés par « S01 » et « S02 » et ensuite nous les avons déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes on a constaté que le tubes de la « S01 » est trouble, donc il y a croissance et nous pouvant déduire qu'elle est résistante à la température élevée, contrairement la « S02 » ne montre pas un trouble, donc ne résiste pas à la température élevée. (Fig.16).



Fig.16 : Résultat du test de thermo résistance.

1-5.2 test d'antagonisme :

Après 3 jours d'incubation des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton et la souche indicatrice (*E. coli*), et ensemencé par la culture bactérienne des deux souches isolés, nous avons observé une zone d'inhibition d'un diamètre de 13mm pour la « S02 » et un diamètre de 6 mm pour la « S01 », ce qui indique une interaction entre les lactobacilles et la bactérie indicatrice ce qui prouve aussi un effet bactéricide du lactobacille contre *E. coli* (Fig.17).

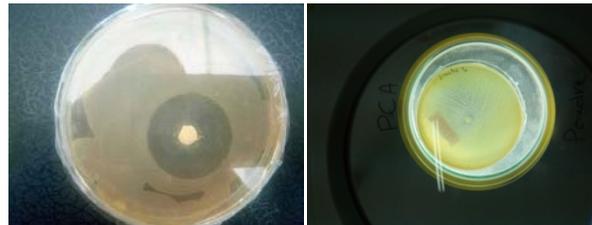


Fig.17 : Résultats d test d'antagonisme

2. Discussion :

A partir des résultats obtenue suite aux études menés sur les caractères physiologiques et résultats des tests biochimiques que nous avons réalisés sur les deux souches isolé nous pouvons confirmés que : la « S01 » appartient aux bactéries *Entérocoques sp* et la « S02 » appartient des bactéries *Lactobacilles sp*.

Nous avons obtenu les mêmes résultats rapportés par les étudiantes **Bahfir et Belguidoum** en **2017**, qui ont confirmé la présence de ces deux souches dans la propolis dans le cadre de leurs travaux réalisé à l'université de BBA pour l'obtention de leur diplôme de master.

- Concernant l'origine de ces bactéries probiotiques, des **chercheurs Suédois de l'université de Lund** proposent une explication : ils ont identifiés un groupe unique de 13 espèces de bactéries lactiques présent dans le jabot des abeilles, dans le miel frais et dans

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

le pain d'abeille frais, ces bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* produisent une importante quantité de composés antimicrobiens qui peuvent inhiber le développement des bactéries indésirables ou pathogènes.

- Selon les résultats de dénombrement des bactéries lactiques dans les échantillons de propolis, que nous avons analysés, nous avons remarqués qu'il y a une différence de dénombrement entre les différents échantillons, notamment l'échantillon 01 (3.10^2 UFC/g), par contre il y a absence de croissance bactérienne concernant l'échantillon 04 cela est du probablement à l'origine des échantillons, à la richesse et à la diversité de la végétation, nos résultats est comparable avec les résultats des étudiantes Bahfir et Belguidoum en 2017.
- Dans notre expérimentation, nous avons étudiés les caractères biochimiques des souches isolées à partir de propolis. Les tests biochimiques constituent une approche classique. Incontournable pour l'identification des bactéries et la détermination de certaine souche, ainsi que de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées. Selon les résultats de tous les tests réalisés, nous avons constatés que les souches obtenus sont *Lactobacillus sp*, mais nous ne pouvons pas identifier l'espèce. Nous avons identifiés seulement le genre.
- Selon les travaux de **Kandler et Weiss, 1986 ; Stiles et Holzappel, 1997** : le profil fermentaire des Lb qui métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaires mésophile d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétéro fermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate, dans nos résultats on a peu constaté que le profile fermentaire de la « S02 » est de nature hétéro fermentaire facultatif, par contre la « S01 » est thermophile de type homofermentaires strict
- Des études réalisées par **Marteau et al.1997**, et ainsi que par **Savaiano et al.1984** ont montrés que le traitement thermique affecte la viabilité des micro-organismes notamment les *Lactobacillus* et leur métabolite. la température est cruciale pour la survire des probiotiques *Lactobacillus* ; la température favorable pour la plus part des probiotiques varie entre 37 à 43°C, à plus de 45°C, au moins une fraction de la population bactérienne sera détruite (**Boylston et al.,2004 ; Champagne et Gardner ,2005 ;Korbekandi et al.,2011 ;Lee et Salminen,2009**).

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

- Selon l'étude réalisé par **Aouabdia et Barkani, 2018** montre que la propolis a un effet antibactérien vis-à-vis de toutes les souches multi résistante *SARM*. Ces résultats confirment les travaux de plusieurs auteurs qui signalent que la propolis possède une activité antibactérienne très importante vis-à-vis des souches à GRAM+. Ceci est du à l'inhibition de la division cellulaire responsable de l'arrêt de croissance des germes et par désorganisation du cytoplasme, des membranes cytoplasmiques et cellulaire ainsi qu'une inhibition de la synthèse de protéines et destruction de la paroi de la cellule bactérienne.
- D'après une **étude japonaise**, la propolis inhiberait la croissance microbienne en bloquant la division cellulaire et en détruisant la paroi bactérienne, et ceci principalement sur les bactéries à Gram positive et à Gram négative et les bactéries anaérobies, dans notre analyse on a constaté qu'il y a une activité antimicrobienne vis-à-vis *E. coli* (diamètre d'inhibition de 6 à 13mm).
- Dans autre étude réalise par **Athmani et al, 2018** montre que : L'activité inhibitrice du miel naturel et de propolis sur *E. coli* et *S. aureus* est semblable à celle des antibiotiques les plus actifs (Vancomycine, Kanamycine, Amikacin, Chloramphénicol, Cefoxitine et Gentamycine), présente des diamètres assez importants pour le miel (23 mm, 20mm) et (12 mm, 25mm) pour la propolis successivement.

CONCLUSION:

La propolis est une substance naturelle collante que les abeilles la produisent et qui est utilisée par eux essentiellement comme un moyen d'hygiène contre les différents pathogènes, et les études scientifiques ont confirmés la présence d'une activité antibactérienne, antifongique et antivirale. La propolis a montré aussi d'autres activités comme antioxydante, antitumorale, anti-inflammatoire, et cicatrisante.(référéncce)

Au cours de cette étude réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie générale, les objectifs fixés étaient d'isoler et d'identifier des souches de lactobacilles. A l'issue de ce travail, des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de quelques produits de propolis sur milieu MRS et purifiées. Les souches isolées ont subies une série de tests biochimiques, physiologiques et d'activité antibacterinne.

Les résultats de l'étude des caractères morphologiques et culturaux (étude macroscopique et microscopique) et des caractères biochimiques (recherche de la de catalase, production de gaz) ont montré que sur deux souches isolées, la souche 02 correspondant au caractéristiques de lactobacilles (forme bacille ou cocobacille, Gram+, catalase négative), et une autre souche (S1) correspond aux caractéristique d'enterocoque (forme cocubacille, catalase positif). Ces deux souches ont été retenues pour la suite de l'étude. notamment les tests physiologiques (température, pH) ont révélé poussent une croissance à pH 9.1 ; et l'étude de l'activité antibactérienne qui a montré que les souches de *Lactobacillus*(S02) est douée d'activité antibactérienne vis-à-vis de *E. coli*.

En effet des zones d'inhibitions de 6 à 12 mm ont été obtenues. Le plus important diamètre d'inhibition est obtenu par la souche (S2).

Pour conclure, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation des souches sélectionnées a partire de propolis appartenant au genre *Lactobacillus* dans l'industrie agroalimentaire dans la fabrication des produits laitiers fermentés. Ces dernières, peuvent êtres utiliser comme bioconservateurs. Cependant le travail effectué est insuffisant pour confirmer ces résultats.

Annexe 1



Balance



Bec benzène



Agitateur



Hotte biologique



Etuve



Vortex



Autoclave



Bain marie



Mortier

Annexe 1



Tube à essai



pipette Pasteur



micropipette



Eprouvette



Boit pétri



Erlenmeyer

Représentation des matériels de laboratoire

Annexe 2

Préparation des solutions et des milieux de culture

1-La préparation de l'eau physiologie :

- o Par spatule porter et peser 9g de NaCl
- o Verser les 9g dans un erlenmeyer et ajouter 1000ml de l'eau distillée
- o Autoclaver à 121°C pendant 15 min
- o Refroidir à température ambiante
- o Conserver dans la réfrigération de 2-8°C

2- Préparation de l'eau péptonée :

- o Porter et ouvrir le flacon de la poudre de l'eau peptonée dans la zone stérile
- o Par une spatule sur une balance, peser la quantité nécessaire 15g
- o Verser les 15g dans un erlenmeyer stérile et continuer la solution par un litre d'eau distillée
- o Mettre la solution sous une agitation douce

3-La gélose MRS (Man, Rogosa, Sharpe) est utilisée pour la culture des Lactobacilles. La sélectivité du milieu est uniquement assurée par son pH (Bey., 2009).

o Ingrédients en gram pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- o Peptone **10,00**
- o Acétate de sodium **5,00**
- o Extrait de viande **10,00**
- o Sulfate de magnésium **0,10**
- o Extrait de levure **5,00**
- o Sulfate de manganèse **0,05**
- o Glucose **20,00**
- o Phosphate di sodique **2,00**
- o Polysorbate **80 1,00**

Annexe 2

o Agar **15,00**

o Citrate d'ammonium **2,00**

Méthode de préparation :

o Nous avons porté et ouvert le flacon de MRS dans la zone stérile près de bec benzène

o Par une spatule nous avons porté et pesé sur une balance 50.25g de MRS

o On verse les 50.25g de l'MRS dans un erlenmeyer

o Par une spatule on porte et pese sur une balance 20g de l'agar

o Nous avons versé les 20g de l'agar dans le flacon qui contient les 50.25g de L'MRS

o Ajouter 1000ml de l'eau distillé

o Mettre en agitation douce (700 rpm) et sous un chauffage de 350°C jusqu'à l'homogénéisation et l'ébullition

o Distribuée l'MRS dans les tubes à essai stérile et les autoclaves à 121°C pendant 15 min

NB : Pour la préparation d'un bouillon d'MRS, nous avons suivi la même méthode, mais sans d'ajoutation de l'agar

3- Préparation de Mueller Hinton :

Tableau 1 : la composition de milieu Mueller Hinton (Chouguiat., Zaarour, 2016)

Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0 g
pH	7,4
Eau distillée	1L

La gélose de Mueller Hinton est reconnue par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques (Chouguiat., Zaarour, 2016).

o Nous avons porté et ouvert le flacon de MH dans la zone stérile près de bec benzène

o Par une spatule nous avons porté et pesé sur une balance 38g de MH

o On verse les 38g de l'MH dans un erlenmeyer

Annexe 2

- o Par une spatule on porte et pesé sur une balance 20g de l'agar
- o Nous avons versé les 20g de l'agar dans le flacon qui contient les 50.25g de L'MRS
- o Ajouter 1000ml de l'eau distillé
- o Mettre en agitation et au chauffage de jusqu'à l'homogénéisation et l'ébullition
- o Puis nous avons autoclavé le milieu et collé les boites par 15ml de MH.

4-Gélose nutritive :

Milieu de croissance qui permet de croître de tous les germes aérobies sans sélection. Incubation à 30 °C durant 3jours pour de dénombrement de *E. coli*.

Gélose nutritive	Composant
Extrait de viande.....	1.0 g
Extrait de levure.....	2.0 g
Peptone.....	5.0 g
Chlorure de sodium.....	5.0 g
Glucose.....	1.0 g
Agar.....	15.0 g
Eau.....	1000 ml

- o Nous avons porté et ouvert le flacon GN de dans la zone stérile près de bec benzène
- o Par une spatule nous avons porté et pesé sur une balance 75g deGN.
- o On verse les 75g de la GN dans un erlenmeyer.
- o Par une spatule on porte et pesé sur une balance 20g de l'agar.
- o Nous avons versé les 20g de l'agar dans le flacon qui contient les 75g de l'MRS
- o Ajouter 1000ml de l'eau distillé.
- o Mettre en agitation et au chauffage de jusqu'à l'homogénéisation et l'ébullition.
- o Puis nous avons autoclavé le milieu et collé les boites par 15ml deGN..

NB : Pour la préparation d'un bouillon d'GN, nous avons suivi la même sans l'ajoutation de l'agar.

Annexe 2

5- Préparation solution de rouge de crésolé :

- o Nous avons porté et ouvert les flacons de rouge de crésol dans la zone stérile près de bec benzène.
- o Par une spatule nous avons porté et pesé sur une balance 0,1g.
- o On verse le 0,1g de rouge de crésol dans un erlenmeyer.
- o Ajouter 1000ml de l'eau distillé dans erlenmeyer.
- o Mettre en agitation douce jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

Annexe 3

Coloration de Gram

Les étapes de coloration de Gram est comme suit :

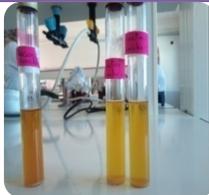
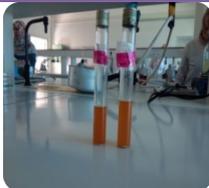
La coloration de Gram à pour but de classer les bactéries selon leur Gram (**G-**, **G+**), leur morphologie (Cocci, Bacille), et leur mode d'association (en chaînette, libre).

Elle est consistée à la coloration d'un frottis à l'aide de réactifs spécifiques, en commençant par l'application du violet de gentiane pendant 30s à 1min. Après nous avons recouverts directe avec Lugol de cette frottis, en procède à une décoloration en versant l'alcool 95% sur la lame inclinée obliquement, puis rinçage avec l'eau distillée et recoloration par la fuschine (30s à 1min). après cette coloration, un rinçage et un séchage sont effectués en utilisant l'eau et le papiers absorbant.

Pour l'observation microscopique (grossissement X 1000), on ajoute une goutte d'huile d'immersion (Amar et Manaa, 2016)

Annexe 4

Résultats des tests biochimiques de nos souches :

	
Résultats de test catalase	Résultats de test oxydase
	
Résultats de test TSI	Résultats de test de fermentation de Glu
	
Résultats de test de fermentation de Lac	Résultats de test de fermentation de Fru
	
Résultat de test de production de gaz	Résultats de test Citrate de Simmons
	
Résultats de test d'uréase	Résultats de test d'indole

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

1-Amrouche.T. (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat en science et technologie des aliments. Université de Laval, faculté des sciences de l'agriculture et des aliments, Québec. 155p.

2-Aouabdia.S et Barkani.CH. (2018).Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des S aureus résistantes à la métilicine : SARM. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de MASTER EN BIOLOGIE Option : Microbiologie Appliquée. Université 8 Mai 1945 Guelma. Page18-19.

3-Athmani.M et al. (2018).L'effet antibactérien du miel et de la propolis sur les bactéries impliquées dans les infections nosocomiales. Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master. Spécialité/Option : Santé, Eau et Environnement : Microbiologie Appliqué. Université 8 Mai 1945 Guelma. Page13.

4-Axelsson.L. (1993). Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S and Von Wright A. pp: 1-63 .Marcel Dekker Inc. New York.

-B-

5- Biri. 2002. LE GRAND LIVRE DES ABEILLES cours d'apiculture moderne Renna Veto, Ed De Vecchi S.A.Paris.

6- Bankova, V., Castro, S.L., Marcucci, M.C., (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31, 3-15.

7-Bahfir.L et Belguidoum.M. (2017). Recherche et identification des bactéries probiotiques (Les lactobacillus.) Dans les produits de l'apiculture. Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Master 2.Spécialité : Analyse et contrôle de qualité des denrées alimentaires. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.page28.

8-Battah.A et Bouhamdani.K. (2017). Isolement et essais d'identification de quelques bactéries lactiques à partir d'un fromage artisanal. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Option : Microbiologie Alimentaire et Santé. Université A. MIRA – Bejaia.page12.

9-Belhadi et Yessad. (2016).L'effet Anti biofilm a base de pro-miel. Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme Master 2 Option: Pharmacognosie et phytothérapie. Page24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

10-Bennai.T et Temine.S. (2017). Isolement de souches de lactobacilles performantes. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Option : Microbiologie Alimentaire Santé. Université A. MIRA – Bejaia. Page14.

11- Banskota, A.H.; Nagaoka, T.; Sumioka, L.Y. (2002). Antiproliférative activity of the Netherlands Propolis and its active principals in cancer celle lines.J. Ethnopharmacol.80n:67-73.

12-Bensidhoum.K et Boudrahem.N. (2017). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre Lactobacillus à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Option : Microbiologie Alimentaire et santé. Université A.MIRA-Bejaia.page17.

13-Bey. (2009). Etude de l'interaction antagoniste entre Lactobacillus sp. Et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de magister option : Microbiologie Alimentaire. Page96.

14-Boucif.W (2017). Etude comparative de la diversité floristique de trois stations de Remchi (Wilaya de Tlemcen) et estimation de la qualité du miel récolté. En vue de l'obtention du diplôme de MASTER En Ecologie et Environnement (Pathologie des écosystèmes). Université de TLEMEN. Page5.

15- Bouadjaib.S.(2013). Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien « Jben », recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du DIPLOME de master en biologie. Université de Tlemcen ABOU BEKR BELKAID.80

16-Boumediene.K.(2013). Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en Biologie. Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien. Université ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMEN.59

17-Boullouf.A. (2016). Etude du Pouvoir Technologique de Quelques Bactéries Lactiques du Fromage Traditionnel "Bouhezza", Thèse de Magister, Université des Frères Mantouri, Constantine, Département de Technologie Alimentaire, p.20, 22, 23.

18-Boumediene. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire en vue de l'obtention du

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

diplôme de magister en Biologie. Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien. Université ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMCEM.59

19-Bouricha.H. (2018).Caractérisation du lait cru de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche : Précisément la flore thermophile et mésophile. Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention du diplôme de Master. Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales.page37.

20-Boussaha.B et Siaf.F. (2018). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de la propolis in VI trO. Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master. Spécialité/Option: Immunologie Appliquée. Université 8 Mai 1945 Guelma.

-C-

21-Cardoso S.M., Ribeiro M., Ferreira I.L., & Carvalho Rego. (2011). Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. Food and chemical toxicology: an international journal published an international published for the British industrial Biological Research Association, 49(11): 2862-8.

22-Cousin L. (2014). L'abeille et le conseil à l'officine. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de POITIERS Faculté de Médecine et de Pharmacie, pp. 77, 21-39.

-D-

23-De Roissart.H et Luquet.F.M. (Janvier 1994). Bactéries lactiques Lorica Uriage1 ; 6-1.

24-De Vos P et al. (2009). Genus Lactobacillus, Bacillus and Listeria. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd.,New York.pp.19-511.

25-Doan.T. L. (2011). Identification et Caractérisation des Déterminants Physicochimiques et Biologiques mis en jeu dans l'Adhésion de Lactococcus lactis à la Mucine Modèle PGM, Thèse de Doctorat, Spécialité : Microbiologie et Biocatalyses Industrielles, Université de Toulouse, page 9.

26-Drider.D et Prevost.H. (2009). Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp 381- 427.

27- Donadieu Y, 2008 : de la faculté de médecine de PARIS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-E-

28-Euzèby.J.P. (2006). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. < <http://www.bacterio.cict.fr/bactico/ II/ apodemi.html>>.

-F-

29-FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report. Cordoba, Argentina.

30- FAO, 2006. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality> Apithérapie : L'abeille est mon amie Rédigé par Alexis Van Wittenberghe , le 11 avril 2014

31-Federighi.M.,et al.(2005). Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2ème édition. Paris : 220 p.

32-Françoise.S. (2012). Les produits de la ruche et la santé humaine .conférence donnée à la salle de Pétrarque de Montpellier, France. 2012. page 12.

-G -

33- Ghedira, K.P., Goetz, R. (2009). Le Jeune..Propolis. Phytothérapie. Vol (7) :100-105.

34-Galvez.A et al. (2011). Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp. 253-390.

35-Gharbi. M. (2011). Les produits de la ruche : origines - fonctions naturelles – composition propriétés thérapeutiques api thérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de Doctorat, Université Claude-Bernard Lyon1.

36-Golder.W. (2004). Propolis. The bee glue as presented by the graeco roman literature. Wurzburger Medizinhistorische Mitteilungen journal, 23, 133-145.

37-Guiraud J.P et Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.

-H-

38-Hennine.Y et Serièr.H. (2017).Isolement et caractérisation des bactéries lactiques dans le smen traditionnel algérien. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master. Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques. Page31.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-J-

39-Joubert.D. (2016). Les Ferments Lactiques, Revue des Ecoles Nationales d'Industrie Laitière, N° 345, p.2.

-K-

40-Kandler.O et Weiss.N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria: Inbergey's manual of systematic bacteriology.Vol.2.(P.H. A. Sneath., Mair, N., Scharpe, M. E., Holt. M. E., éd.).Williams. & Wilkins ,Baltimore, pp.1208-1260.

41- Krell R, 1996: value edded products form beekeeping. Food and agriculture organization of the United Nations Rone.

-L-

42-Lakermi.H. (2018).Propriétés Physico-chimiques de Quelques Échantillons de Miels Produits dans la Région de Tlemcen. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de : MASTER EN CHIMIE .Spécialité: Chimie des Produits Naturels. Université Abou-Beker Belkaid – TLEMEN. Page4.

43-Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens : p180.

44-Leonard, L. (2013). Evaluation du Potentiel Bioprotecteur des Bactéries Lactiques Confinées dans une Matrice Polymérique, Thèse de Doctorat, Discipline : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, p.8.

45-Leveau J-Y et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle : les uorg d'intérêt industriel. Edition : Tec&dac-Lavoisier : 170.171.181

46-Luquet.FM et Correiu.G. (2005). Bactériocines de Bactéries lactiques. In: « Bactéries lactique et probiotiques ». TEC 1 DOC éd., Paris. France. pp. 113-194

-M-

47- Mami.A. (2007). Recherche des bactéries lactiques productrice de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de DOCTORAT. Université d'Oran AHMED BEN BELLA.161

48-Mattarelli.P et al. (2014). Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera Bifidobacterium, Lactobacillus and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64(4):1434-1451.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

49-Mayo et al. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Blackwell Publishing (2010). Chapitre 1. Disponible en ligne sur <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780813820866.ch1>.

50- Mebrek.S. (2019). Etude des propriétés biologiques de l'association du bêta glucane de l'orge et des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle chez les rats Wistar.

Thèse De DOCTORAT. Spécialité : Sciences biologiques. Université Djilali Liabes Sidi Bel Abbes. Page 41.

51-Meziani.M. (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Mémoire présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magistère. Université Mentouri CONSTANTINE. Page 68.

52- Metzner, J., Schneidewind, E. M. (1997). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. Pharmazi 33.

53-Millette.M et al. (2008). Characterization of probiotic properties of Lactobacillus strains. Dairy Sci. Technol. 88: 695-705.

54-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.

-N-

55-Nader.Elhousseini. (2013). Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco- Dentaire. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire. Université de dantes. Page 19.

56- Nahdi.S. (2016). Caractérisation des bactéries Psychotropes de deux types aliments. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de master Ecologie microbienne.

(Viande de Volaille et de Poisson Sardine). Université MENTOURI CONSTANTINE. 50

-O-

57-Orla-Jensen. (1919). The Lactic bacteria Hosledson copen: 74: pp 131-142.

-P-

58-Poulain.F. (1994). Evolution de la préparation commerciale des ferments lactiques in : les bactéries lactiques, T1, Aspects fondamentaux et technologies. Ed, Loriga, Lavoisier. p 604.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

59- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X. & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflammatory. Food Chemistry . Toxicology, 63: 233-239.

-R-

60-Renneberg R., Berkling V., Loroeh V. & (2017). Biotechnology for Beginners (Second Edition). Chapter 5 – Viruses, Antibodies, and Vaccines. : 165, 167–200.

61- Ravazzi. G., 2003 - Abeilles et apiculteurs. Ed. De Vecchi, Paris, 155 p.

62-Rebai.H et Saidi Siaf .CH. (2017).Identification d'une souche cariogène Streptococcus sp et étude de l'action antibactérienne du miel de colza et de la propolis sur cette souche. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes. Université des Frères Mentouri Constantine. Page8-10.

-S-

63- Sattler J.A.G., Pereirade M., Granato D., Araújo E ., da Silva de Freitas A. & Barth O.M. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. Food Research International, 77, part 2 : 82, 91

64- Sallofe.Coste. (1994).Lactis acid bacteries. Dannone News latter n°5 July.

65-Salminen.S et al.Demonstration of safety of probiotics – a review, Int. J.Food Microbiol. 44 (1998) 93-106.

66-Sanders.ME. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J. Nutr. 130(Suppl): 384-390.

67-Schleifer.K. H et Ludwig.W. (1995). Phylogeny of the genus Lactobacillus and related genera. System Appl Microbiol 18: 461-467.

68-Schnizler.P et al. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extrats and selected compound. Phytother Res 24(Suppl. 1) : 20-8.

69-Soltana.Z. (2017). Isolement et identification des lactocoques isolés à partir du lait cru de chamelle. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master.Spécialité : Exploitation des Ecosystèmes microbiens laitiers. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem page30.

70- Sauvager, F. (2014). La propolis: définition, récolte, propriétés et utilisation: (3) : 18-33.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

71-Soltani.K. (2017). Caractérisation et activités biologiques de substances naturelles, cas de la propolis.Mémoire Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences. Option : Génie des procédés pharmaceutiques. UNIVERSITE FERHAT ABBAS – SETIF-1.page4.

72-Stiles.M.E et Holzapfel.E.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current applications and effects. Meat Sci. 65: 935-948.

-T-

73-Tabak.S et Bensoltane.A. (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidus* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran.9.

-V-

74-Vasiljevic.T et Shah.NP. (2008).Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. Int. Dairy. J.18: 714–728.

75- Valente M.J., Baltazar A.F., Henrique R., Estevinho L. & Carvalho M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food Chemistry Toxicology , 49 (1):86-92.

-Y-

76-Yang et al. (2011). Antioxydant compound from propolis collected in Anhui, China. Molecules, 16: 3444-3455.

-Z-

77-Zergoug.A. (2017). Effet des Probiotiques et Bactériocines Vis-à-vis des Pathogènes Responsables des Infections Urinaires, Thèse de Doctorat, Spécialité : Microbiologie Appliquée, Université de Mostaganem, p.4.

Les sites web :

<http://www.aloemagazine.com/propolis-abeille/>

<http://www.lesruchersdargonne.com/Propolis.htm>

<http://blog.exometeofraiture.net/blog/2016/10/23/apiculture-propolis/>