

Remerciment

الْحَمْدُ لِلَّهِ
الَّذِي بِنِعْمَتِهِ تَتِمُّ الصَّالِحَاتُ

Je remercie en premier lieu le grand DIEU

*« Louange à vous dieu jusqu'à ce que vous êtes satisfait et louange à vous si vous
Etes satisfait ».*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadrant **Mme Labtar Asma** de m'avoir accordé toute sa confiance ; pour le précieux temps qu'elle m'a consacré tout au long de cette période, pour ses précieux conseils et ses encouragements permanents. Ses qualités pédagogiques remarquables m'ont permis de profiter de ses connaissances et ont contribué à l'avancement de mon travail.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury **Mme Sidhoum Warda** d'avoir accepté de présider mon travail. Ainsi que **Mme Bennama Rabha** d'avoir examiné mon mémoire.*

*Mes remerciements les plus sincères à toute l'équipe du laboratoire de l'université Abd El Hamid Ibn Badis MOSTAGANEM et plus particulièrement à **Mr Abaidi**, **Mme Saidi** et leurs collègues pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle.*

*Un grand merci à **Mr Sowan** et **Mr Benbouziane** pour leurs conseils scientifiques, leur aide bénéfique, leur gentillesse et pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre durant cette période.*

*Mes sincères salutations et remerciement envers tous les professeurs que j'ai croisé au cours de mon cursus universitaire tel que **Mme Dalache**, **Mr Hammoum**, **Mr Djibaoui**....*

Ainsi qu'aux techniciens de laboratoire

Dédicace

*Au nom de Dieu clément et miséricordieux.
Au prophète de la paix, de la miséricorde et de la lumière.*

*A celui que dieu a donné le prestige et la dignité, celui qui m'a indiqué la bonne voie, le plus adorable et gentil papa au monde **MAAMAR**, celui qui m'a tout donné sans rien recevoir en parallèle,*

*A la plus merveilleuse de toutes les mamans. Ma maman **YAMINA** Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur ; l'amour, le dévouement et le respect que je porte pour toi. Puisse Dieu tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, beaucoup de santé et de bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.*

*A ma sœur **CHAFIKA** et son petit ange **MEHDI** ; Ma grande sœur
Merci de si bien accomplir ton rôle, merci d'être toujours l'a mes coté, de me prêter ton épaule quand j'en ai besoin. De me soutenir dans mes études et mon travail. Tu as toujours su me levée vers le haut et m'encourager pour atteindre mes rêves les plus fous. Mille mercis à toi. Tu es la sœur que tout le monde rêve d'avoir.*

*Merci à mes chères frères **AMINE, ABDELWAHID** et **TOUFIK**
Pour votre dévouement, votre compréhension et votre tendresse. Merci pour vos encouragements et pour la protection que vous m'apporté toujours. Vous êtes les hommes de ma vie sans qui je n'aurai jamais étais la femme que je suis aujourd'hui,
Ainsi qu'un merci pour vos enfants. Mes neveux adorés **LILYA, NIHEL, ADAM, IMAD, ANES, SOFIA, ALAE**, et **KAMILIA** pour la joie que vous nous apporter. Je ne saurais exprimer l'amour et la tendresse que j'ai pour vous.*

*A tous mes amies qui me sont chers et proches
Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance que je vous dois.*

Naziha.

Résumé

La pré-identification des bactéries passe obligatoirement par l'observation des caractères phénotypiques et physico-chimiques qui conduisent à définir le genre. Ces analyses doivent être appuyées par la recherche de quelques caractéristiques technologiques. Ce travail a permis de traiter à échantillons de laits cru de deux origines (chèvre et vache) et s'est focalisé essentiellement sur l'isolement des souches de lactobacilles mésophiles, Six souches ont été isolées. Elles présentent des aptitudes technologiques très intéressantes comme l'activité antibactérienne sur le plan antagonisme et la synthèse des exopolysaccharides (EPS).

Mots clés : *Lactobacillus*, exopolysaccharides (EPS), activité antibactérienne, activité protéolytique.

Abstract

The pre-identification of bacteria necessarily involves observing the phenotypic and physio-chemical characteristics that lead to defining the genus. These analyzes must be supported by the search for a few technological characteristics. This work made it possible to process samples of raw milk from two sources (goat and cow) and focused mainly on the isolation of strains of mesophilic lactobacilli. Six strains were isolated. They have very interesting technological abilities such as antibacterial activity in terms of antagonism and the synthesis of EPS.

Key words: *Lactobacillus*, exopolysaccharides EPS, antibacterial activity, Proteolytic activity

ملخص

يتم استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك تجريبياً لعدة قرون في تصنيع العديد من الأطعمة المخمرة، ويتضمن التحديد المسبق للبكتيريا بالضرورة ملاحظة الخصائص المظهرية، الفيزيائية والكيميائية التي تؤدي إلى تحديد النوع. يجب دعم هذه التحليلات بالبحث عن بعض الخصائص التكنولوجية.

أتاح هذا العمل بمعالجة عينات من الحليب الخام من مصدرين مختلف (الماعز والبقر) وركز بشكل أساسي على عزل سلالات المضاد للبكتيريا *EPS* العصيات اللبنية المتوسطة، لقد تم عزل ستة سلالات ذات قدرات تكنولوجية مثيرة للاهتمام للغاية مثل النشاط من حيث العداء وتوليف.

كلمات الأساسية: بكتيريا حمض اللاكتيك، نشاط مضاد للجراثيم

EPS. Lactobacillus

Table des matières

Liste des figures	i
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction	iv
Revue bibliographique	01
▪ 1. Définition	01
▪ 2. Classification phylogénétique du groupe Lactobacilles	01
▪ 3. Composition chimique du lait.....	03
3.1. Le lait de vache.....	03
3.1.1. Les protéines du lait de vache.....	03
3.2. Le lait de chèvre.....	04
3.2.1. Les protéines du lait de chèvre.....	04
3.3. Composition en vitamines du lait de chèvre et de vache	07
▪ 4. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques.....	07
4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	07
4.2. Caractères morphologiques	07
▪ 5. Propriétés fonctionnelles technologiques des bactéries lactiques	08
5.1. Propriétés technologiques	08
5.1.1. Activité acidifiante.....	08
5.1.2. Activité protéolytique.....	09
5.1.3. Activité lipolytique.....	09
5.1.4. Activité aromatisante.....	09
5.1.5. Production des substances inhibitrices.....	09
5.1.6. Production des exo-polysaccharides (EPS).....	11
5.1.7. Performance	11
5.2. Propriétés spécifiques aux probiotiques	12
5.2.1 Les principales souches microbiennes à potentielprobiotique.....	12
▪ 6. Critères de sélection des probiotiques.....	14
6.1. Critères de sécurité.....	14
6.1.1. Identification de la souche.....	14

6.1.2. Innocuité.....	14
6.1.3. Critères fonctionnels.....	15
6.1.4. Survie au cours du transit digestif.....	15
6.1.5. Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus	15
6.1.6. Colonisation.....	16
6.1.7. Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé... ..	16
▪ 7. Applications des bactéries lactiques	16
7.1. Applications industrielles.....	17
7.2. Dans le domaine pharmaceutique et thérapeutique	18
▪ 8. Identification génotypique des bactéries.....	18
8.1. Identification par l'amplification de l'ADN 16S	18
8.2. Amplification par PCR (Reaction de Polymérisation en Chaîne) de l'ADNr16.....	18
8.2.1. Les principales étapes de la PCR..... ;.....	19
Matériels et méthodes	21
▪ 1. Objectif.....	22
▪ 2. Le lieu de travail.....	22
▪ 3. Provenance des échantillons.....	22
▪ 4. Les souches de références utilisées.....	23
▪ 5. Milieux de culture des souches.....	23
▪ 6. Isolement des souches lactiques	23
▪ 7. Purification des souches.....	24
▪ 8. Conservation des souches a longue durée.....	24
▪ 9. Caractéristiques phénotypiques des souches.....	24
9.1. Examen macroscopique	24
9.2. Examen microscopique	24
▪ 10. Pré-identification des bactéries lactiques isolées.....	25
10.1. Coloration de GRAM.....	25
10.2. Tests biochimiques.....	26
10.3. Croissance a différentes températures	26

11. Aptitudes technologiques des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées	26
11.1. Activité antibactérienne	26
11.2. Activité protéolytique	27
11.3. La production des exopolysaccharides (EPS).....	27
Résultats et discussion	28
1. Isolement et purification	29
2. Pré-identification des souches	29
2.1. Aspect macroscopique.	29
2.2. Aspect microscopique.	29
3. Aptitudes technologique des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées	32
3.1. Activité antibactérienne	32
3.2. Activité protéolytique... ..	34
3.3. Production des exopolysaccharides (EPS).....	36
Conclusion	37
Références bibliographiques	40
Annexe	46

Liste des figures

Figure 01 Arbre phylogénétique du groupe Lactobacilles basé sur des alignements concaténés de quatre sous-unités (α , β , β et δ) de l'ARN polymérase ADN-dépendante	02
Figure 02 Vue microscopique d'un <i>Lactobacillus Caséin</i> (Gx4000).....	08
Figure 3 : Les étapes de déroulement de la PCR.....	20
Figure 04 : La procédure suivie pour l'isolement des bactéries lactiques.....	23
Figure 05 : les différentes étapes de la coloration de Gram.....	25
Figure 06 : La procédure suivie pour le test catalase	26
Figure 07 : Aspect macroscopique de colonies de la souche L4Gr×1000.....	29
Figure 08 : Aspect microscopique de la souche L1 Gr×1000	30
Figure 09 : Aspect microscopique de la souche L2 Gr×1000	30
Figure 10 : Aspect microscopique de la souche L3 Gr×1000	30
Figure 11 : Aspect microscopique de la souche L4 Gr×1000	30
Figure 12 : Aspect microscopique de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC2592Gr×1000.....	31
Figure 13 : Culture de la bactérie <i>E.coli</i> ATCC2592.....	32
Figure 14 : l'activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> L1, L4.....	33
Figure 15 : l'activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> L2, L3.....	34
Figure 16 : l'activité protéolytique des souches de <i>Lactobacillus</i>	35
Figure 17 : aspect macroscopique des colonies de la souche L4 sur milieu saccharose.....	36

Liste des tableaux

Tableau 01 Fraction des protéines du sérum du lait de chèvre	05
Tableau 02 Propriétés des principaux nutriments du lait de chèvre.....	07
Tableau 03 Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'homme	13
Tableau 04 Détails concernant les échantillons utilisés... ..	22
Tableau 05 Résultats d'identification phénotypiques et biochimiques des isolats lactiques (LAB)	31
Tableau 06 : activité antibactérienne des souches de <i>Lactobacillus</i> vis à vis <i>E.coli</i> ATCC2592	33
Tableau 07 : Valeurs moyennes du diamètre de la zone de protéolyse	34

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

LAB : bactéries lactiques.

C° : Degré Celsius.

D° : Degré Dornic.

EPS: exopolysaccharides.

FAO: Food and Agriculture Organisation des Nations unies

FEMS: Federation of European Microbiological Societies.

g : gramme.

GN : gélose nutritive

h : heure

Kpb : kilo paires de base.

L : *lactobacillus*.

BLG : béta-lactoglobuline

Mb : mégabase

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre

MRS : De Man, Rogosa et Sharpe

NaCl : chlorure de sodium.

Pdt : Pendant.

s : secondes.

T° : température.

Trs: tours

µl : microlitre.

V : volume.

INTRODUCTION

Introduction

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant JC dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), époque où les végétaux et les animaux sont domestiqués (Fox, 1993).

La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 (Lister, 1873).

Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine.

Le genre *Lactobacillus* se compose d'un groupe génétiquement et physiologiquement diversifié de bactéries Gram positif en forme de bâtonnet, non sporulées, non pigmentées.

L'objectif de cette étude se résume dans l'isolement des souches de bactéries lactiques à intérêt technologique et probiotique. Les isolements des bactéries lactiques (les lactobacilles) se sont réalisés à partir de lait cru de chèvre et de vache de différentes régions d'Algérie et leur caractérisation par la recherche des activités technologiques et probiotiques.

Cette étude est constituée de 3 parties

La première partie consiste en :

L'étude bibliographique qui porte sur les connaissances des bactéries lactiques en général et sur les lactobacilles en particulier.

La deuxième partie est composée :

D'une méthodologie de travail qui rassemble tous les matériels et méthodes utilisés pour exécuter les travaux de cette étude.

La troisième partie englobe :

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

Une discussion des résultats.

Une conclusion général et perspectives

CHAPITRE I

Revue bibliographique

1. Définition

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis*, Probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873.

Elles sont des micro-organismes vivants et unicellulaires (procaryotes) très répandus dans la nature car elles se reproduisant rapidement.

Elles sont : Gram-positif, généralement immobiles, a sporulées, anaérobies mais aérotolérantes

2. Classification phylogénétique du groupe Lactobacilles

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par (Beijerinck, 1901). Les critères phénotypiques restent encore très importants aujourd'hui pour leur classification (Schleifer *et al.*, 1985). Le genre est composé de plus de 60 espèces et est génétiquement assez divers. Le pourcentage en bases G + C dans leurs génomes varie entre 32 et 54 %.

Parmi les lactobacilles, la taille du génome varie entre 1,86 Mb à 3,31 Mb pour *L. bulgaricus* et pour *L. plantarum*, respectivement (Liu, 2003). En 2006, avec le séquençage de 9 génomes de bactéries lactiques, Makarova *et al.* Proposent une nouvelle classification des lactobacilles en se basant sur l'analyse comparative de génomes (Makarova *et al.*, 2006) (**figure 01**). Le nouvel arbre phylogénétique a été construit en se basant sur les alignements des 4 sous-unités (α , β , β et δ) de l'ARN polymérase ADN dépendante.

Cette étude suggère que *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont proches et se retrouvent insérés dans le groupe *Lactobacillus*, contrairement à la classification.

Proposée antérieurement où *Leuconostoc* faisait partie du groupe *Oenococcus*.

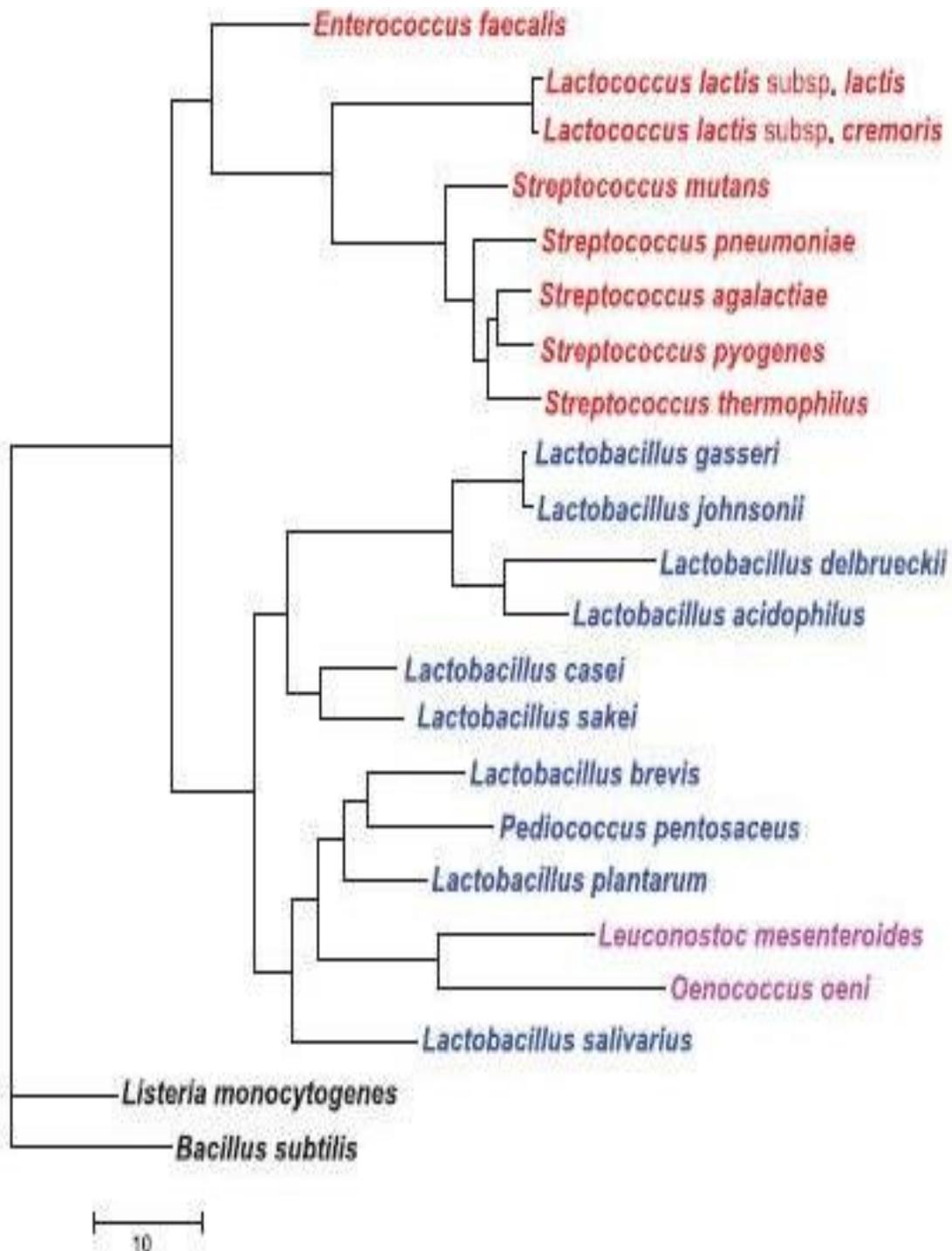


Figure 01 : Arbre phylogénétique du groupe Lactobacilles basé sur des alignements concaténés de quatre sous-unités (α , β , β et δ) de l'ARN polymérase ADN-dépendante.

L'arbre a été construit en utilisant le programme MOLPHY. Les espèces sont selon la taxonomie : *Lactobacillaceae* ; *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*. Selon (Makarova *et al.* 2006)

3. Composition chimique du lait

La composition du lait varie selon les espèces animales mais aussi selon différents facteurs tels que la race, la période de lactation, l'alimentation, les variations saisonnières, l'âge, la zone géographique.

L'eau est le constituant principal du lait. La proportion des autres constituants varie selon les espèces.

3.1. Le lait de vache

Il contient les trois types de nutriments principaux (glucides, lipides, protéines), des sels minéraux tels le calcium et le phosphore, des vitamines, ainsi que l'hormone de croissance du veau (somatomédine C).

3.1.1. Les protéines du lait de vache

❖ Les caséines

Les caséines représentent 82% des protéines du lait de vache et ne se retrouvent qu'à 60% dans le lait maternel humain (Debry *et al.*, 2001).

Il existe 4 types qui peuvent se regrouper sous forme de micelles :

- Les caséines α_1 (protéines les plus abondantes dans le lait car représentent environ 40% des protéines).
- Les caséines α_2 .
- Les caséines β .
- Les caséines γ .

❖ Les protéines du lactosérum

Les principales protéines du sérum sont :

➤ La bêta-lactoglobuline (BLG)

Est la protéine principale du lactosérum, elle y est présente à 55%. Une partie de cette protéine est hydrophobe. Sa structure tertiaire a la capacité de fixer la vitamine A et certains acides gras (lebeuf *et al.*, 2002)

➤ **L'albumine sérique**

Généralement appelée « Sérum Albumine Bovine (SAB) », elle représente 7% des protéines du sérum. Les immunoglobulines

➤ **Les immunoglobulines**

Ces protéines, se présentant sous forme d'un « Y » et jouant un rôle d'anticorps, constituent environ 13% des protéines du lactosérum. Elles sont transférées du sang au lait au niveau des cellules des glandes mammaires ; La lactoferrine

➤ **La lactoferrine**

Cette protéine porteuse de fer représente 4% des protéines du sérum (Lebeuf *et al.*, 2002).

➤ **Le lactose**

Est un sucre a beaucoup d'importance nutritionnelle pour le nouveau-né lors de sa première année de vie car il représente sa principale source de glucides (Vesa *et al.*, 2000).

3.2. Le lait de chèvre

Le lait de chèvre apparaît comme un choix santé de par ses multiples qualités nutritionnelles, sa richesse en vitamines et ses vertus thérapeutiques au cours des différents âges de la vie.

3.2.1 Les protéines du lait de chèvre

❖ Les caséines

Elles représentent la partie la plus important des protéines ; elles se distinguent par une série propriété structurelles qui leur sont propres est qui ont une importance en ce qui concerne les comportements chimique et technologique. L'aptitude du lait à la coagulation, la rhéologie des cailles, certains comportement d'affinages sont lies directement à la structure et la composition de la micelle de caséine.

Il existe 4 types de caséines qui peuvent se regrouper sous forme de micelle

- Les caséines α_1 (protéines les plus abondantes dans le lait car représentent environ 40% des protéines).
- Les caséines $\alpha S1$.
- Les caséines $\alpha S2$.
- Les caséines α .

❖ **Les protéines de sérum**

Elles représentent 20.4 % du totale azotés, trois fois moins des sérums albumine dans le lait de chèvre par contre il y a plus de lactoglobulines (par rapport au lait de vache) (**Tableau 01**)

Tableau 01 : Fractions des protéines du sérum du lait de chèvre.

	Chèvre
Immunoglobulines	18.3
β -Lactalbumines	71
Globulines	-
β - Lactoglobulines	74.
Sérum albumine	0.6

➤ **Azotes non protéiques ANP**

La composition de l'ANP a été déterminé par urée 65%, acide amine libres 17%, créatines 2%, la créatinine 1.5 %, NH_3 0,8%, acide urique 0.6%, autres 13.8%.

➤ **Carbohydrates**

Ils sont solubles dans l'eau et présents dans la phase aqueuse du lait à un seuil de 5%. Le lactose est le principal constituant et présente une faible solubilité et précipite en surface et prend une texture granuleuse.

➤ **Le lactose**

L'hydrate de carbone principal du lait de chèvre est le lactose avec 44% et sa concentration ne varie pas excessivement durant la lactation et sa teneur varie de 44 à 47g/l. (Goursaud, 1987) C'est le sucre spécifique du lait, il est synthétisé dans la mamelle à partir de glucose. Celui-ci provient essentiellement de la néoglucogenèse (85% d'origine hépatique, 15% rénale).

❖ **Les enzymes**

➤ **La phosphatase alcaline**

Elle est adsorbée à la surface de la membrane des globules gras ou associée aux lipoprotéines. Cette enzyme est détruite à 70 °C en trente secondes, son activité est réduite de 75% à 60°C pendant trois minutes.

➤ **La phosphatase acide**

Elle est localisée dans le lactosérum, fortement activée par l'acide ascorbique, et stable.

➤ **La lipase**

La lipoprotéine lipase est impliquée dans les problèmes de lipolyse spontanée et induite. Elle est fortement thermolabile, inactivée dans le lait en quelques secondes par un chauffage à 72 °C ou quelques minutes à 60 °C.

➤ **Le lysozyme (muramidase)**

Appartenant au groupe des hydrolases, cette enzyme lyse la paroi de certaines bactéries.

➤ **La xanthine oxydase**

Cette enzyme est une oxydoréductase associée à la membrane des globules gras. Le lait de chèvre en quatre fois moins que le lait de vache (Jenness, 1980). La variation de teneur de l'enzyme est liée au stade de lactation (**Tableau 02**)

Tableau 02 : Propriété des principaux nutriments du lait de chèvre

Nutriment	Fonctions	Bien fait pour la santé
Protéines Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Thr, Trp, Phe ,Val	Sources d'acides aminés essentielles à la synthèse des protéines a les parois cellulaires fibres musculaires, enzymes er hormones	Prévention contre le retard de croissance. Résistance de défense contre les infections.
Les minéraux Calcium	Formations de l'os, contraction musculaire	Prévention d'ostéoporose et de fracture de l'hypertension.

3.3. Composition en vitamines du lait de chèvre et de vache

La teneur moyenne en vitamines du lait de chèvre et de vache, données recueillies dans la littérature sont des valeurs qui doivent être considérées comme des ordres de grandeurs. En effet, plusieurs facteurs de variation sont intégrés dans ces données :

La race, la saison, l'état physiologiques, le niveau de lactation, la méthode d'analyse

4. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques

4.1. Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles font partie du phylum des *Firmicutes*, de la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Lactobacillales* et de la famille des *Lactobacillaceae*. Ces bactéries ont une forme de bâtonnets qui sont souvent groupés en chaînettes (Leveau etBouix, 1993).

4.2. Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, courts ou coccobacilles. La formation de chaîne de cellules est courante (De Vos *et al*, 2009) ; **(Figure 02)** montre l'aspect microscopique d'une souche d'un *Lactobacillus Casei*

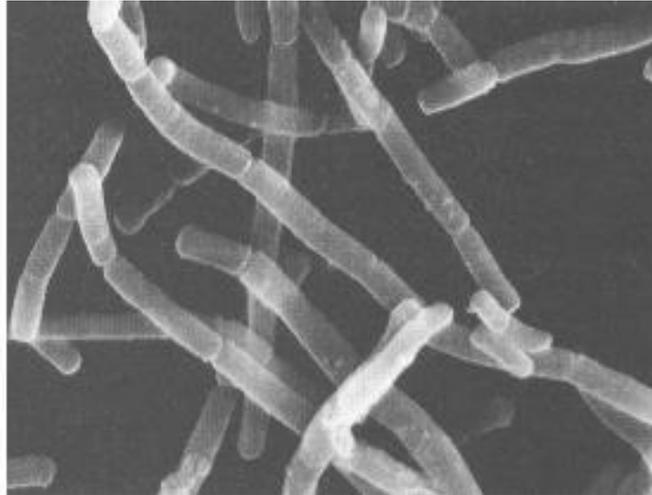


Figure 02 : Vue microscopique d'un *Lactobacillus casei* (Gx4000)

5. Propriétés fonctionnelles technologiques des bactéries lactiques

5.1. Propriétés technologiques

L'utilisation des bactéries lactiques ou probiotiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : (Stiles et Holzapfel, 1997).

5.1.1. Activité acidifiante

La transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004).

L'activité acidifiante d'une bactérie dans un produit se décline en trois descripteurs :

- La production d'acide lactique qui confère au produit fini une saveur acide et, par son action sur la diminution de pH, a également un rôle protecteur contre d'éventuelles contaminations par des germes indésirables (flore d'altération ou pathogènes).
- La cinétique d'acidification qui est la vitesse de production d'acide lactique (Accolas *et al.*; 1979).
- La post-acidification qui correspond à une cinétique d'acidification résiduelle lors de la conservation et stockage du produit (Béal *et al* ; 2008).

5.1.2. Activité protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009).

5.1.3. Activité lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactobacilles sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009).

5.1.4. Activité aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (Tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formate, ...etc.) Principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1994 ; Cholet, 2006).

5.1.5. Production des substances inhibitrices

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme,; 1994) ces mécanismes antimicrobien ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

a) Les acides organiques

Comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits par les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaire. Leurs effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (Davison *et al.*; 1995).

Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (Alakomi *et al.* ; 2000).

L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible).

b) Peroxyde d'hydrogène

Agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (Klaenhammer *et al.* ; 1994).

Elles sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. En conséquence, l'H₂O₂ produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents.

c) Dioxyde de carbone (CO₂)

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (Lindgren et Dobrogosz ; 1990).

d) Le diacétyle

Est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers ; les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries à Gram positif.

Le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine, toutefois, le diacétyle est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (Caplice et Fitzgerald.; 1999).

e) Les bactériocines

Sont des produits de la synthèse ribosomique bactérienne (protéines) libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée. Elles possèdent une activité bactéricide à large spectre (Caplice et Fitzgerald.; 1999).

5.1.6. Production des exo-polysaccharides (EPS)

La présence de ces souches productrices d'EPS dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour les différentes industries de la fermentation

Plusieurs bactéries lactiques synthétisent des EPS exo-cellulaires qui comprennent à la fois des polysaccharides capsulaires et des boues EPS. Ce dernier peut être lié de manière lâche à la paroi cellulaire ou libérée dans les environnements exacellulaires (Rodriguez *et al.*; 2014).

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle Pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Welman et Maddox; 2003) ; Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire.

5.1.7. Performance

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries.

Les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes (Béal *et al.*, 2008) :

- Résistance aux bactériophages et aux traitements mécaniques
- Tolérance aux inhibiteurs de croissance (antibiotiques, saccharose, l'acidité, l'éthanol et la température élevée) ;
- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation et à la conservation ;
- Comportement en présence d'oxygène ;
- Croissance à des températures non optimales ;
- Compatibilité avec d'autres souches ;
- Facilité d'emploi.

5.2. Propriétés spécifiques aux probiotiques

En plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (Da Cruz *et al.*, 2007 ; Ouwehand *et al.*, 2002).

Une partie des bactéries lactiques peuvent être ingérées vivantes et peuvent offrir un certain nombre de caractéristiques probiotiques. La définition officielle des probiotiques est la suivante:

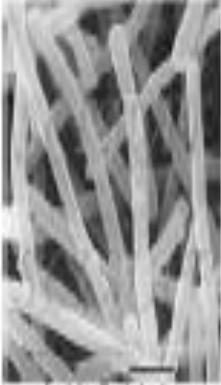
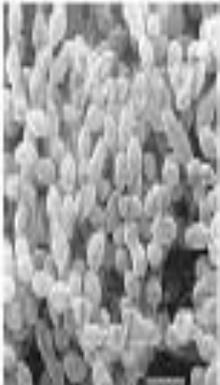
« Microorganisme vivant qui ingéré en quantité suffisante procure un effet bénéfique sur la Santé de l'hôte » (FAO, 2003). Des centaines de produits commercialisés sous forme D'aliments fermentés ou de compléments alimentaires contiennent des bactéries probiotiques. La plupart de ces bactéries appartiennent au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* mais certaines levures présentent également des fonctions probiotiques.

Les principaux effets prouvés des probiotiques sont la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction des intensités des épisodes diarrhéiques, ainsi que la réduction de l'intolérance au lactose. Les lactobacilles ont également d'autres effets bénéfiques moins bien étudiés comme la synthèse de vitamines B, l'amélioration de l'absorption de nutriments, la dégradation de facteurs antinutritionnels, la modulation de la physiologie du système digestif, et récemment la diminution de la perception de la douleur.

5.2.1 Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique

Les genres microbiens les plus utilisées comme probiotiques en alimentation humaine sont : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Tableau 03**). Par contre en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Probionibacterium*, *Sacharomyces*, *Aspergillus* et *Torilopsi*.

Tableau 03 : Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'homme (Hozalpfel *et al.*, 1998).

Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
 <p>LACTOBACILLUS BULGARICUS</p>	 <p>BIFIDOBACTERIUM BREVE</p>	 <p>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</p>	 <p>SACCHAROMYCES sp.</p>
<p><i>L. acidophilus</i> La5 (Chr. Hansen) <i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco) <i>L. casei</i> Shirota (Yakult) <i>L. casei</i> DN-114 001 (Danisco) <i>L. reuteri</i> ATCC 65730 (Biogate) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 (Miyuki) <i>L. gasserii</i> K7 (Miyuki) <i>L. johnsonii</i> La1 (Miyuki) <i>L. paracasei</i> CRL431 (Chr. Hansen) <i>L. paracasei</i> F19 (Miyuki) <i>L. plantarum</i> 299V (Miyuki) <i>L. rhamnosus</i> GG (Yakult) <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i></p>	<p><i>B. longum</i> BB836 (MoriNaga) <i>B. breve</i> Yakult (Yakult) <i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr. Hansen) <i>B. lactis</i> HN019 (Danisco) <i>B. animalis</i> DMI 73010 (Danisco) <i>B. infantis</i> 35264 (Procter & Gamble)</p>	<p><i>S. thermophilus</i> 1131 (Miyuki) <i>E. faecalis</i> Symbiofor (Symbiofor) <i>E. faecium</i> SP68 (Danisco) <i>P. acidilactici</i> Bactocell® (Lallemand)</p>	<p><i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Biocodex) <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 (Miyuki) <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i></p>

6. Critères de sélection des probiotiques

6.1. Critères de sécurité

6.1.1. Identification de la souche

Il est nécessaire de caractériser de manière précise les souches utilisées. La détermination taxonomique d'une souche potentiellement probiotique est une étape indispensable.

Les souches probiotiques doivent être identifiées via des méthodes moléculaires fiables de détermination du phénotype et du génotype. Pour spécifier l'appartenance d'une souche à une espèce, l'hybridation ADN-ADN est la méthode de référence, mais le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est une technique tout aussi pertinente. L'identification de la souche doit ensuite être réalisée avec une méthode ; de génétique reconnue telle que l'électrophorèse en champ pulsé.

Les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelon international.

A chaque souche est attribué un code alphanumérique d'identification choisi par le laboratoire ou la collection. Une fois identifiées, les bactéries probiotiques doivent être nommées selon les règles du Code International de Nomenclature des Bactéries pour une compréhension universelle (Nom du *genre* / nom de l'*espèce* / identifiant de la souche) (Butel, 2014).

6.1.2. Innocuité

Un microorganisme probiotique doit être non toxique et exempt de toute pathogénicité. Il est important de l'évaluer précisément pour chaque souche potentiellement probiotique, en étudiant tout effet indésirable possible (résistance aux antibiotiques, activités métaboliques nocives, production de toxines, potentiel infectieux, activité hémolytique). La plupart des microorganismes reconnus probiotiques sont d'usage courant en agroalimentaire depuis de nombreuses années. Leur consommation de longue date sans risque établi pour l'Homme demeure la meilleure preuve de leur sûreté. Selon cette approche, il a été dressé une liste de souches probiotiques jugées historiquement sécuritaires. On parle de souches à statut **QSP** (Qualified Presumption of Safety) en Europe ou **GRAS** (Generally Recognized As Safe) aux Etats-Unis

6.1.3. Critères fonctionnels

Afin d'être conformes à la définition établie par la FAO/OMS, les microorganismes utilisés comme probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs sur la santé de l'hôte.

Les exigences fonctionnelles des probiotiques sont établies à l'aide de tests *in vitro* qui se réfèrent à des propriétés bactériennes et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits.

6.1.4. Survie au cours du transit digestif

Les probiotiques ingérés doivent être vivants dans le tube digestif et donc survivre durant le transit. La capacité de survie varie considérablement d'une souche à l'autre selon leur résistance intrinsèque, mais aussi en fonction de la dose.

Au niveau de l'estomac, la survie des probiotiques dépend de leur capacité à tolérer le pH faible du suc gastrique. Ainsi, certaines souches peuvent rester totalement cultivables après 1h30 à pH=2.

Tout microorganisme probiotique doit avoir une tolérance élevée à l'acidité du milieu stomacal. Il a été démontré que cette résistance était augmentée par l'ingestion de nourriture en même temps que celle du probiotique (Tortora *et al.*, 2007). Il semble également que les souches possédant le cyclopropane acid synthase résistent mieux à l'acidité. Cette propriété serait notamment due à la capacité de l'enzyme à stabiliser la membrane en diminuant la perméabilité aux protons H⁺.

L'étude de la résistance à l'acidité gastrique est généralement réalisée à l'aide de modèles très simplifiés. L'approche utilisée implique de cultiver la souche étudiée, centrifuger, laver puis suspendre les cellules dans un milieu acidifié et dénombrer les bactéries ayant survécu au stress acide qui leur a été imposé.

6.1.5. Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est l'un des critères de sélection les plus importants des probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et la croissance

L'adhésion permet d'augmenter le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin pour mieux résister aux mouvements péristaltiques intestinaux. Il est généralement admis que l'effet probiotique aura d'autant plus de chance d'être maximal que le microorganisme vivant séjournera longtemps dans le tube digestif (Roy, 2006).

6.1.6. Colonisation

La question de la colonisation intestinale par les probiotiques a longtemps fait l'objet de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. Il est maintenant démontré que les probiotiques ne s'implantent pas, ils transitent dans le tube digestif jusque dans les selles, parfois sans avoir adhéré ou s'être multipliés (Tortora et Derrickson, 2007)

Les probiotiques colonisent donc temporairement le tractus digestif et font ainsi partie du microbiote allochtone. Leur persistance est plus ou moins longue, de deux à vingt jours en moyenne selon les souches sélectionnées.

Les souches ayant une durée de persistance élevée sont à privilégier. Une consommation régulière de probiotiques semble donc indispensable pour obtenir un effet bénéfique persistant (Roy, 2006).

6.1.7. Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé

La plupart des souches faisant l'objet d'études sont sélectionnées en laboratoire sur leurs aptitudes fonctionnelles, c'est-à-dire sur leur activité enzymatique, leur aptitude à moduler le système immunitaire ou leur activité antimicrobienne.

Deux modèles cellulaires sont principalement utilisés pour la mesure des propriétés immunomodulatrices des bactéries probiotiques : les cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) ou les lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon humain Caco-2 et HT-29.

7. Applications des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 2004). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle.

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières

premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale.

7.1. Applications industrielles

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Soto *et al.*,2009).

➤ La panification

Les levains boulangers ou pâtisseries contiennent des espèces lactiques comme *lactobacillus plantarum* *lactobacillus casei*, *leuconostoc mesenteroides* qui contribuent à la formation d'arômes et interviennent sur la texture de la pâte.

➤ L'ensilage

Les fourrages sont conservés par fermentation lactique en utilisant des lactobacilles, des pédiocoques et des leuconostocs.

➤ Les aliments fermentés

Les légumes (choux, navets carottes) sont essentiellement fermentés par *leuconostoc mesenteroides*, *lactobacillus plantarum* et *pediocoques*. (Novel G.;1993).

➤ Les produits carnés

La fermentation des viandes fait participer les espèces de bactéries lactiques (Novel G.; 1993).

➤ La fabrication fromagère

Les bactéries lactiques sont introduites dans le lait sous forme de « levains » lactiques, encore appelés « ferments », leur action dans la fabrication fromagère est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme : la production d'acide lactique et l'activité protéolytique.

➤ La Coagulation du lait

L'intérêt de la coagulation est de permettre la concentration des constituants du lait, parla séparation du caillé (concentré) et du lactosérum (très riche en eau), cette coagulation est la principale fonction des bactéries lactiques.

Elle correspond à la précipitation des protéines rendues insolubles par l'abaissement du pH dû à l'acide lactique.

➤ Dans l'affinage

Les bactéries lactiques sont les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages à pâte pressée (Cheddar, fromages rouge), et de fromages sans croûte ou à croûte artificielle fabriqués en France à partir de lait pasteurisé ; elles sont aussi prédominantes dans les fromages frais

7.2. Dans le domaine pharmaceutique et thérapeutique

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la production de bactériocines (Rodriguez *et al.*, 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (Langella *et al.*, 2001).

8. Identification génotypique des bactéries

Les méthodes phénotypiques classiques d'identification des bactéries lactiques semblent moins fiables et nécessitent une méthode plus précise (Salminen *et al.*, 2004), ce qui a fait appel aux méthodes d'identification génotypique telles que l'amplification et le séquençage de l'ADNr16S, PCR en temps réel.

8.1. Identification par l'amplification de l'ADN 16S

L'identification des isolats bactériens a été entrepris par séquençage du gène codant pour L'ARNr 16S.

L'amplification du gène ADNr16S se fait par l'incorporation de deux amorces universelles complémentaires des extrémités 5'et 3' du gène.

8.2. Amplification par PCR (Reaction de Polymérisation en Chaîne) de l'ADNr 16S

La PCR est une technique de répllication ciblée in vitro qui a été conçue au début des années 80 par un chercheur américain, Kary Mullis. La PCR permet la sélection rapide, l'isolement et l'amplification des régions d'ADN d'intérêt, de longueur définie et peut être utilisée pour aider à préparer l'ADN pour le séquençage. Elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon complexe d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique, elle peut être adaptée à

plusieurs niveaux d'identification (genre, espèce) de la souche en fonction du choix des amorces (courte séquence oligonucléotidique).

L'amplification de fragment d'ADN s'agit de réaliser une succession de réactions, la réplication d'une matrice double brin d'ADN. Un thermocycleur automatisé permet de réaliser et répéter des cycles d'amplification d'acides nucléiques de trois phases : une phase de dénaturation, une phase d'hybridation et une phase d'élongation (**Figure 03**)

8.2.1. Les principales étapes de la PCR

➤ Dénaturation

Consiste à la séparation des deux brins d'ADN par augmentation de la température quelques secondes.

➤ Hybridation

En abaissant la température ; les amorces spécifiques « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cible et s'hybrident sur les molécules simples brin d'ADN. Les amorces sont des courtes séquences d'ADN complémentaires de la séquence de l'ADN à amplifier.

➤ Elongation

Consiste à la synthèse du brin complémentaire, la Taq-Polymérase ajoute à l'extrémité de l'amorce hybridée des oligonucléotides présent dans le milieu de réaction.

Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir estimer la taille des produits d'amplification, (Poitrassé, Houde, 2002)

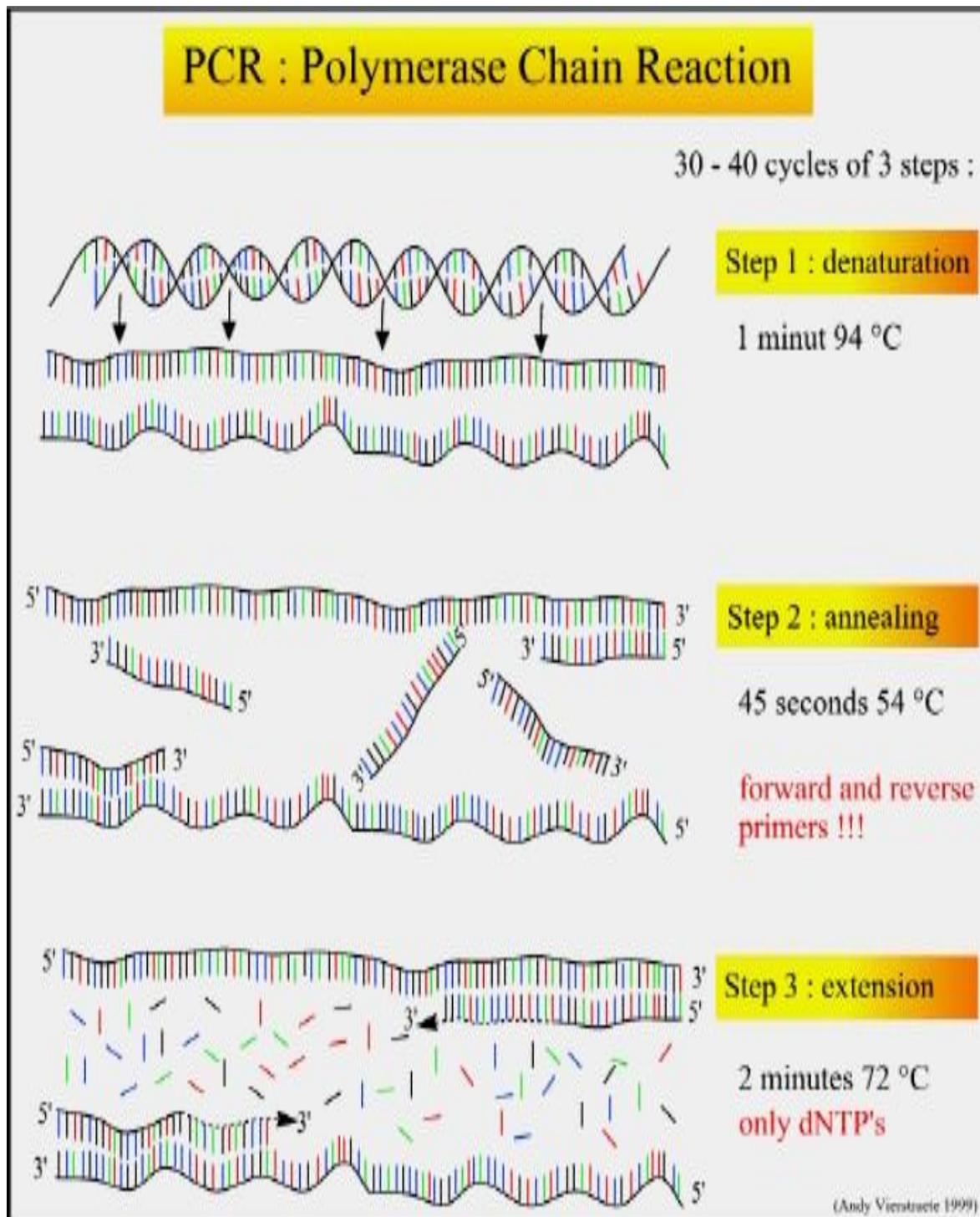


Figure 03 : Les étapes de déroulement de la PCR (Poitras et Houde, 2002).

CHAPITRE II

Matériel et Méthodes

1. Objectif

L'objectif principal de cette étude consiste principalement sur l'isolement et l'identification phénotypique de certaines souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vache et de chèvre de race locale de deux régions d'Algérie (Mostaganem et Oran) par les étapes suivantes :

- ✓ Isolement des bactéries.
- ✓ Identification phénotypique des isolats lactiques et la recherche de quelques caractéristiques biochimiques et physiologiques.
- ✓ Recherche des aptitudes technologiques des isolats lactiques.

2. Le lieu de travail

Les travaux ont été effectués dans les laboratoires pédagogiques (1,2) de l'université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem.

3. Provenance des échantillons

Sept échantillons de lait cru de vache, chèvre de race locale ont été collectés pour réaliser cette étude. (**Tableau 04**)

Les échantillons ont été prélevés à l'aide de traite manuelle de manière aseptique dans des flacons de verre stériles, transportés dans des boîtes isothermes acheminés au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation

Tableau 04 : Détails concernant les échantillons utilisés

Nombre d'échantillons	Code de la souche Après isolement	Nature du lait	La région
3	L1, L3	Vache	Mostaganem
4	L2, L4	Chèvre	Oran

4. Les souches de références utilisées

Nous avons utilisé une souche de référence dans cette étude dont *E. Coli* ATCC2592 comme souche indicatrice pour l'activité antibactérienne.

5. Milieux de culture des souches

L'isolement s'est fait sur deux milieux.

- MRS (DE Manet *al.*, 1960), pour la culture des lactobacilles (voir annexe).
- Gélose nutritive (GN) pour la culture des souches pathogènes (voir annexe).

6. Isolement des souches lactiques

Après la fermentation du lait, une série de dilutions de 1 ml de lait fermenté a été homogénéisé dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique 0.85% (voir annexe). Chaque suspension a été homogénéisée pendant 2 à 3 minutes puis des dilutions décimales sont réalisées de l'ordre de 10^{-1} , 10^{-7} .

Les dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant de la gélose MRS (Ph=6,5) et incubé a 37°C dans des conditions d'anaérobiose pendant 72h. (**Figure 04**)

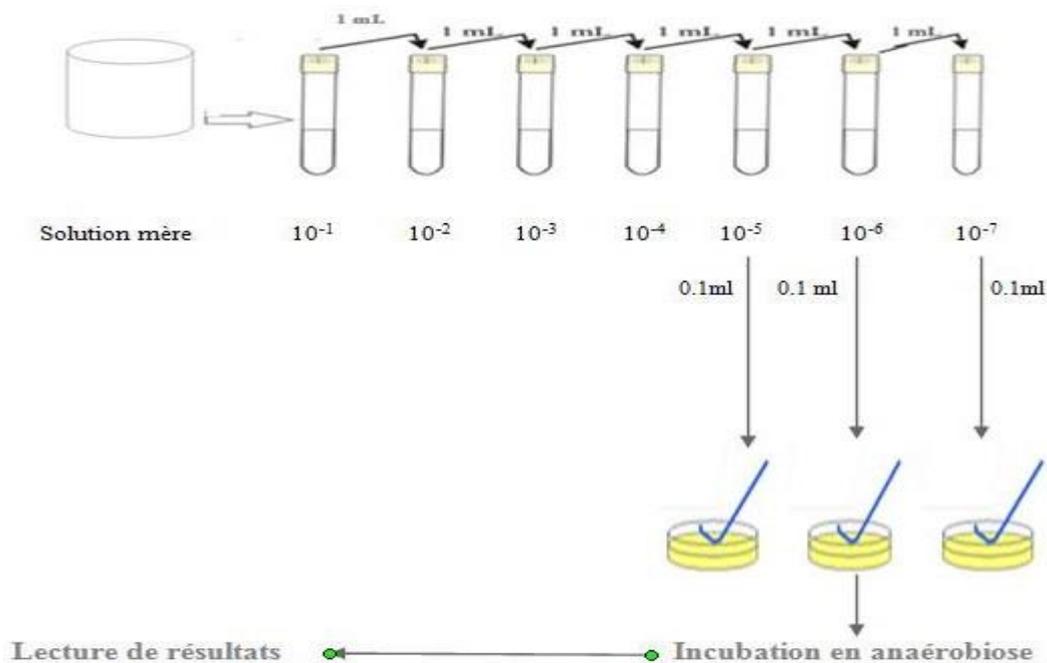


Figure 04 : La procédure suivie pour l'isolement des bactéries lactiques.

Toutes les souches ont été initialement testées par des tests physiologiques simples dont la réaction de Gram, la morphologie cellulaire, la réaction de catalase (3 % H₂O₂). (Mora *et al.*, 2002).

7. Purification des souches

A partir des colonies obtenues, des purifications sont effectuées sur milieu MRS solide/solide ; solide/liquide par repiquage successif. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois des colonies identiques bien distinctes. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par l'observation macroscopique (l'aspect des colonies) et microscopique des cellules après coloration de Gram (forme).

8. Conservation des souches a longue durée

A partir de jeunes cultures (48h-72h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 12000 trs/min pendant 20 min à 4°C. Les surnagent sont jetés puis les culots Récupérés ensuite additionnés avec le milieu de conservation ; MRS additionné à 20 % (v / v) de glycérol. Les cultures des souches ont été conservées en tubes eppendorfs à -20 °C (Accolas *et al.*, 1979).

9. Caractéristiques phénotypiques des souches

9.1. Examen macroscopique

Est basée sur l'observation à l'œil nu des colonies obtenues sur les boîtes pétri contenant le milieu de culture afin de déterminer la taille, la couleur, la forme, l'aspect et le contour des colonies.

9.2. Examen microscopique

Sur des cultures jeunes et sur des frottis fixés des colorations de Gram ont été réalisées. L'observation microscopique au grossissement (Gx1000) permettra d'observer la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association ainsi que le type de Gram.

10. Pré-identification des bactéries lactiques isolées

10.1. Coloration de GRAM

A. Préparation du frottis

- **Étalement.** L'étalement doit se faire en couche mince, sur une lame dégraissée (bien nettoyer, séché).
- **Séchage.** Laisser sécher à l'air.
- **Fixation.** Passer trois fois rapidement dans la flamme du bec Bunsen la face de la lame opposée à l'étalement. Ne pas trop insister sous peine de carboniser le prélèvement.

B. Les étapes de la coloration de Gram

Sur le frottis fixé

- Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane laisser agir 30-60s
- Rincer la lame avec l'eau déminéralisée
- Mordançage au lugol ; laisser agir 1min
- Décolorer rapidement à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée Et surveiller la décoloration.
- Rincer la lame avec l'eau déminéralisée
- Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine et laisser agir 30-60s
- Rincer avec à l'eau déminéralisée et laisser sécher à l'air ou à la flamme
- Observer avec le microscope optique à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion (Christian Gram ; 1984) (**Figure 5**).

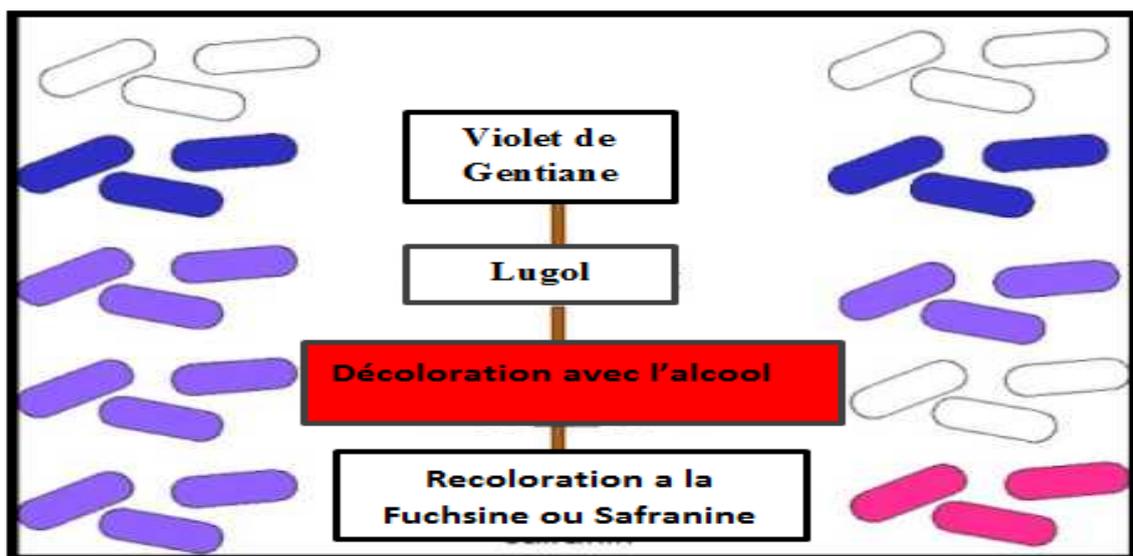


Figure 05 : Les différentes étapes de la coloration de Gram

10.2. Tests biochimiques

A. Catalase

- A l'aide d'un compte-gouttes ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte de H_2O_2 à 3% sur une lame propre.
- A l'aide d'une anse d'inoculation stérile, prélever une colonie bien isolée d'une culture pure et placer-la sur la goutte préalablement déposée.
- Observe la formation immédiate de bulles ($O_2 + \text{eau} = \text{bulles}$). (**Figure 06**)

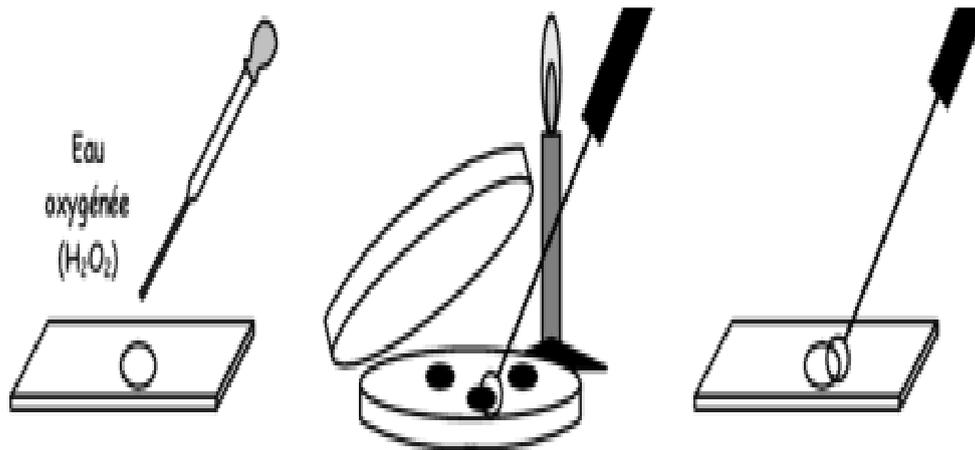


Figure 06 : La procédure suivie pour le test catalase

10.3. Croissance a différentes températures

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 72h d'incubation à 30°C et 45°C.

11. Aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus* isolées

11.1. Activité antibactérienne

Les souches lactiques isolées ont été testées pour la production d'un composé antimicrobien contre des bactéries pathogènes.

La souche indicatrice, *Escherichia coli* ATCC2592 a été cultivé dans des boites puis des bouillons nutritifs à 37 °C pendant 24h.

Les cultures ont étéensemencés sur les boites de pétri contenant MRS à l'aide d'un écouvillon stérile. Ensuite les boites ont été séchées pendant 15 minutes, puis utilisées pour le test de sensibilité.

30µl de cultures jeune de 24h-72 h est ajouté à des disques stériles en papier (diamètre 6mm) et placés sur la surface de l'agar MRS.

Ensuite les boites ont été incubées à 37°C pendant 72 heures. Après l'incubation, les boites ont été examinées pour vérifier la formation de zones d'inhibition autour des disques.

11.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée sur gélose et mesurée par une modification de la méthode de (Guiraud ., 1998). Une culture de 24h de chaque isolat de *Lactobacillus* a été centrifugée à 13 000 ×g pendant 5 min et le culot a été remis en suspension dans un tampon phosphate (20 mM, pH 7).

10µl de chaque suspension cellulaire estensemencée à la surface de la gélose MRS additionnée à 10 % de lait écrémé. Après incubation à 37°C pendant 72 h, le diamètre de la zone claire entourant les spots inoculés a été déterminé (mm).

11.3. La production des exopolysaccharides (EPS)

La production des EPS a été testé sur milieu hypersaccharosé avec un pH ajusté à 7 (voir annexe). Les souches à tester ont étéensemencées en stries sur milieu gélosé (Gordana R. Dimié., 2006). La production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes et très visqueuses (Leveau et Bouix ., 1993).

CHAPITRE III

Résultats et discussion

1. Isolement et purification

Dans notre étude les isolats de bactéries lactiques (lactobacilles) ont été obtenus à partir des sept échantillons collectés de lait cru de vache et chèvre. On a ciblé l'isolement de Lactobacilles mésophiles. Les bactéries à Gram positif et catalase négative sont sélectionnées lors de cette étude.

Quatre isolats ont été sélectionnés comme lactobacilles mésophiles et ont été utilisés pour la caractérisation biochimique comme le montre le (**Tableau 05**).

2. Pré-identification des souches

2.1. Aspect macroscopique

Les colonies développées sur milieu MRS solide sont moyennes avec un pourtour irrégulier (**Figure 07**).

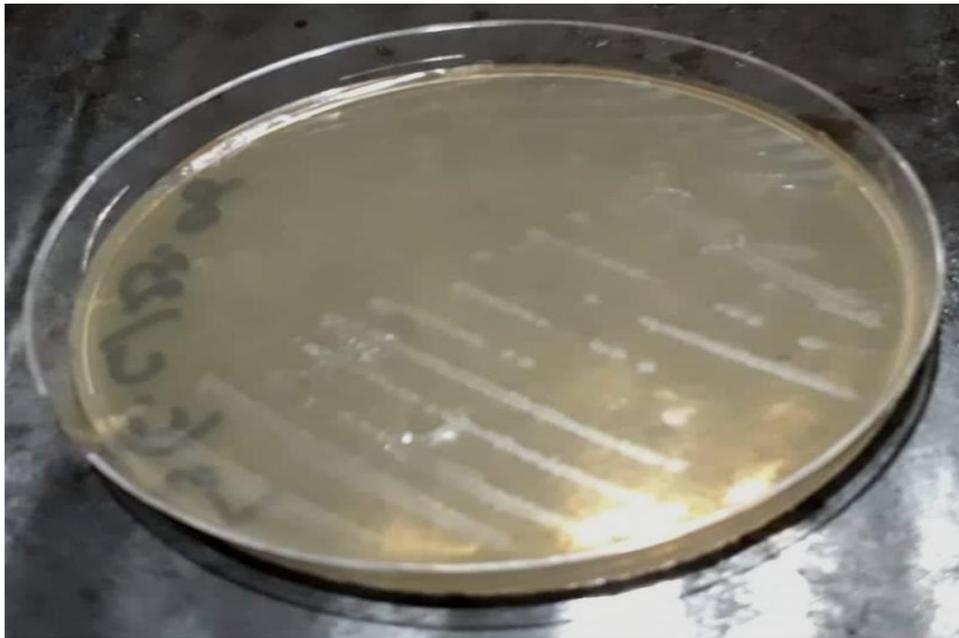


Figure 07 : Aspect macroscopique de colonies de la souche L4

Gr×1000

2.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique de souches de lactobacilles après coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies pures, révèle la présence de cellules très allongées, enroulées et en segments (**Figure 8, 9, 10 et 11**)



Figure 08 : Aspect microscopique de la souche *L1*
Après coloration de Gram (Gr×1000)

Figure 09 : Aspect microscopique de la souche *L2*
Après coloration de Gram (Gr× 1000)

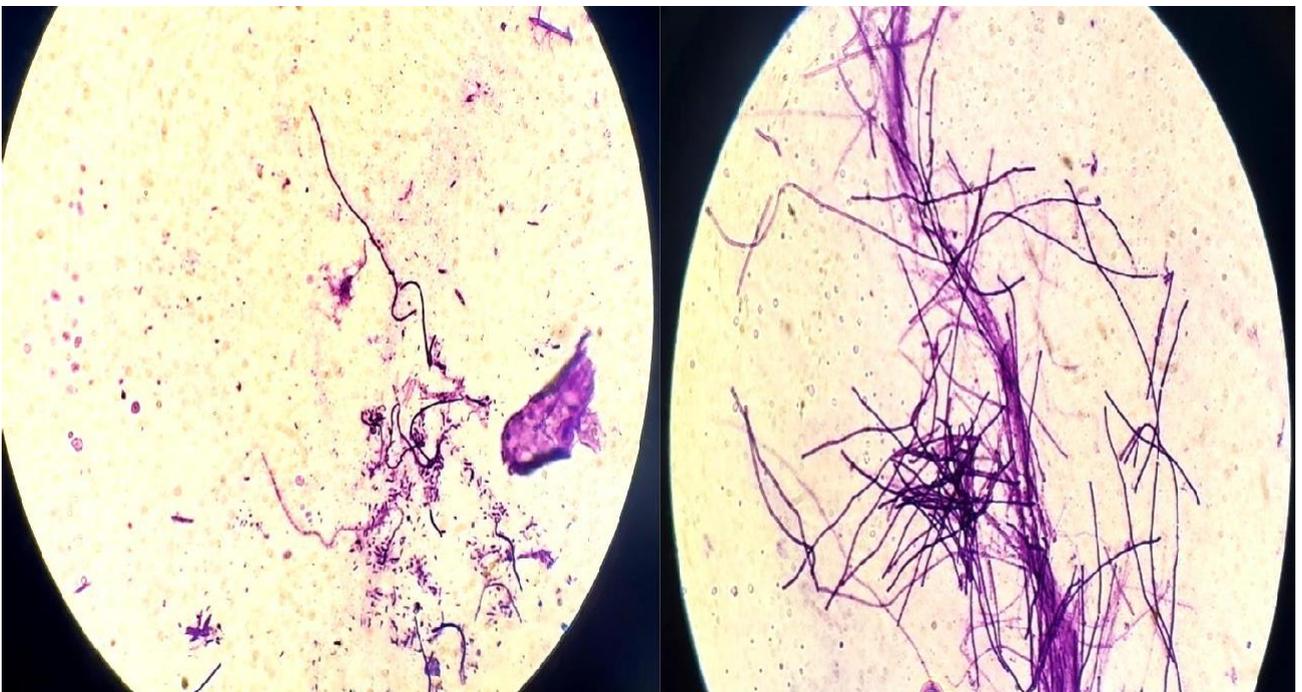


Figure 10 : Aspect microscopique de la souche *L3*
Après coloration de Gram (Gr× 1000)

Figure 11 : Aspect microscopique de la souche *L4*
Après coloration de Gram (Gr× 1000)

L'observation microscopique de la souche *Escherichia coli* ATCC 2592 après coloration montre des bacilles courts à gram négatif (**Figure 12**).

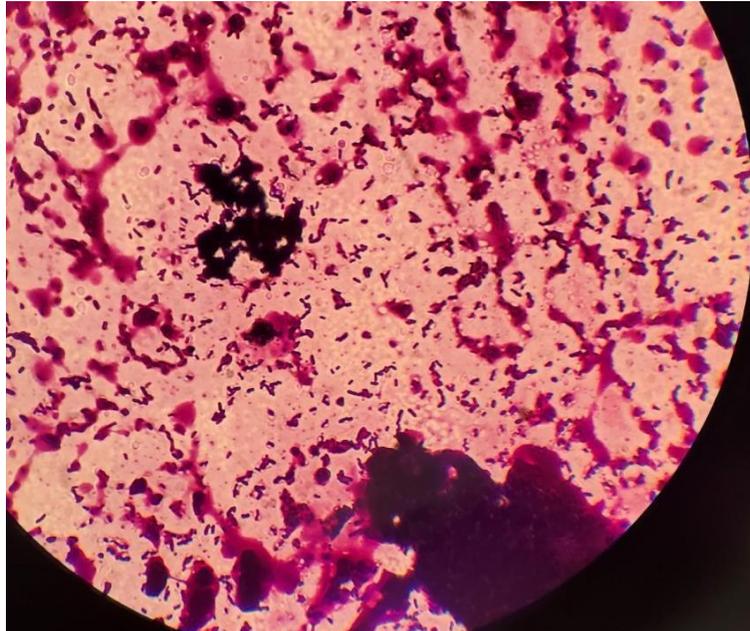


Figure 12 : Aspect microscopique de la souche *Escherichia coli* ATCC 2592 Après coloration de Gram (Gr×1000)

Tableau 05 : Résultats d'identification phénotypiques et biochimiques des isolats lactiques(LAB)

Caractéristiques phénotypiques et biochimiques	<u>L'appellation des souches lactiques</u>			
	L1	L2	L3	L4
➤ Morphologie	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
✚ Gram	+	+	+	+
✚ Catalase	-	-	-	-
➤ Croissance a	-	-	-	-
✚ 45°C	+	+	+	+
✚ 30°C	+	+	+	+

+ Réaction positive

- Réaction négative

3. Aptitudes technologiques des souches

3.1. Activité antibactérienne

La bactérie *Escherichia coli* ATCC 2592 a été utilisée comme une souche indicatrice pour tester l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles sélectionnés dans cette étude *Escherichia coli*2592 a été cultivé sur le bouillon et la gélose nutritive (GN) (**Figure 13**)

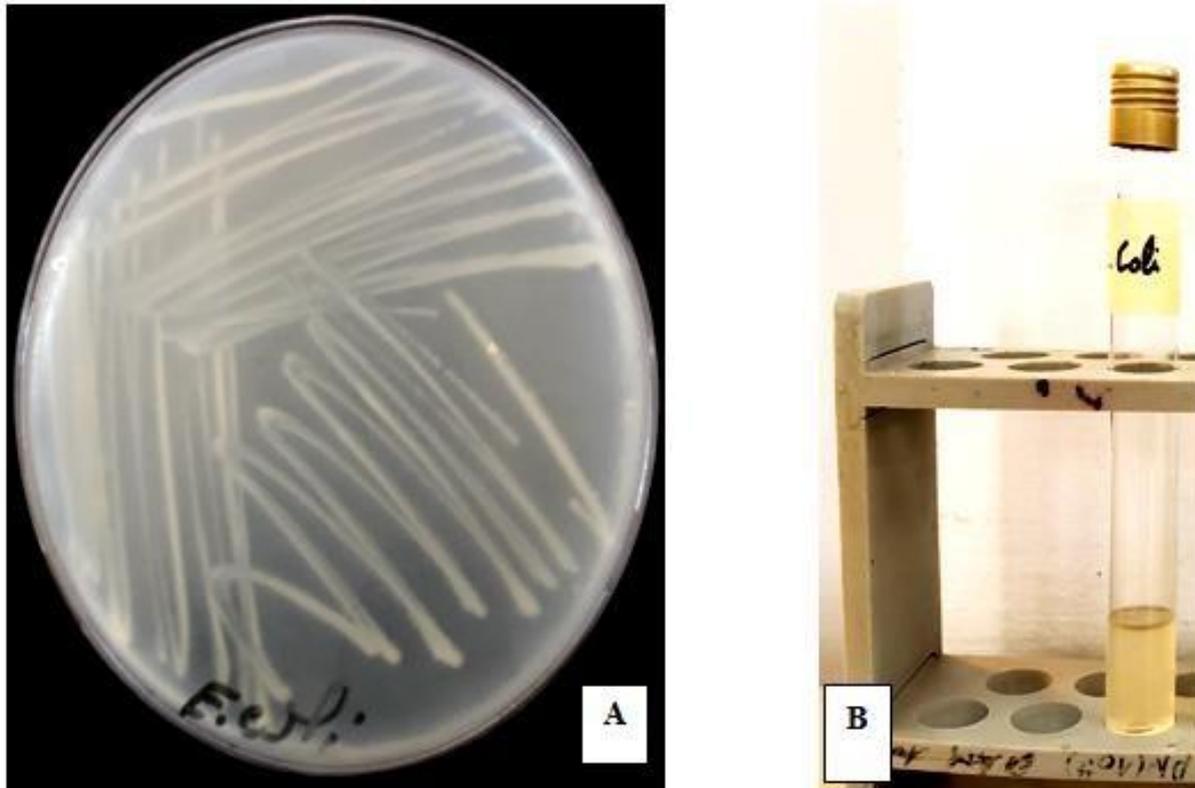


Figure 13 : Culture de la bactérie *E.coli* ATCC2592 .

A : sur gélose GN

B : dans le bouillon GN

Toutes les souches de *Lactobacillus* ont montré une activité inhibitrice contre la bactérie *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés en mesurant le diamètre de la zone claire autour des disques (mm). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 06** et les **figures 14** et **15**

Tableau 06 : Activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* vis à vis *Escherichia coli*.

Souches lactiques	Diamètre de la zone d'inhibition en mm
L1	7
L2	10
L3	8
L4	22

En général toutes les souches de *Lactobacillus* ont été capables d'inhiber la croissance contre l'agent pathogène *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition entre (7 mm et 22mm). Ces souches produisent des substances antimicrobiennes contre *Escherichia coli* ATCC2592. De nombreuses études ont confirmé que les souches de *Lactobacillus* ont des propriétés antibactériennes contre les bactéries a Gram négatif comme (*E. coli*) telles que trouvées par (Labtar *et al.*, 2019 ;Ammor *et al.*,2005) .

Lactobacillus L4 a présenté une forte inhibition vis-à-vis *E. coli* ATCC2592 avec un large diamètre d'inhibition (22mm). Les souches L1et L3 ont montré presque le même diamètre d'inhibition. Toutes les souches de *Lactobacillus* (L1, L2, L3, L4) ont la capacité d'inhiber la souche indicatrice a gram négatif *Escherichia coli* ATCC2592. Dans cette étude la souche L4 est la souche la plus performante.



Figure 14 : L'activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* L1, L4



Figure 15 : L'activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus* L2, L3

3.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique a été vérifiée par la mesure du diamètre d'une zone claire entourant les halos (mm) (Tableau 07), (Figure 16).

Tableau 07 : Valeurs moyennes du diamètre de la zone de protéolyse

Souches lactiques	Diamètre de la zone de protéolyse (mm)
L1	5
L2	11
L3	16
L4	19

Résultats et discussion

L'activité protéolytique est l'une des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques qui participe à l'amélioration de la qualité organoleptique du produit laitier final.

Dans cette étude, l'activité protéolytique des souches isolées a été traduite par la présence d'un halo clair entourant les spots sur la gélose. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches lactiques isolées ont montré une activité protéolytique. Des résultats similaires ont été rapportés par (Papamaloni *et al.*, 2003 ; Labtar *et al.*, 2019)

Les diamètres des halos clairs des souches de *Lactobacillus* ont été compris entre 5mm et 19mm.

La souche L4 a montré un halo d'hydrolyse de diamètre le plus large (19 mm) tandis que la souche L2 et la souche L3 ont montré des diamètres des halos qui ont été respectivement (11 mm, 16 mm) (**Tableau 07, Figure 16**).

La souche L1 a montré un halo d'hydrolyse de diamètre le plus faible (5mm) comparativement aux autres souches.

Dans notre étude, Les résultats ont montré que toutes les souches de *Lactobacillus* ont été capables d'hydrolyser les caséines du lait contribuant à la production de saveurs souhaitables qui intéressent l'industrie alimentaire. (Pescuma *et al.*, 2011). La production de bons produits laitiers de qualité fermentée dépend des propriétés protéolytiques des bactéries de départ.

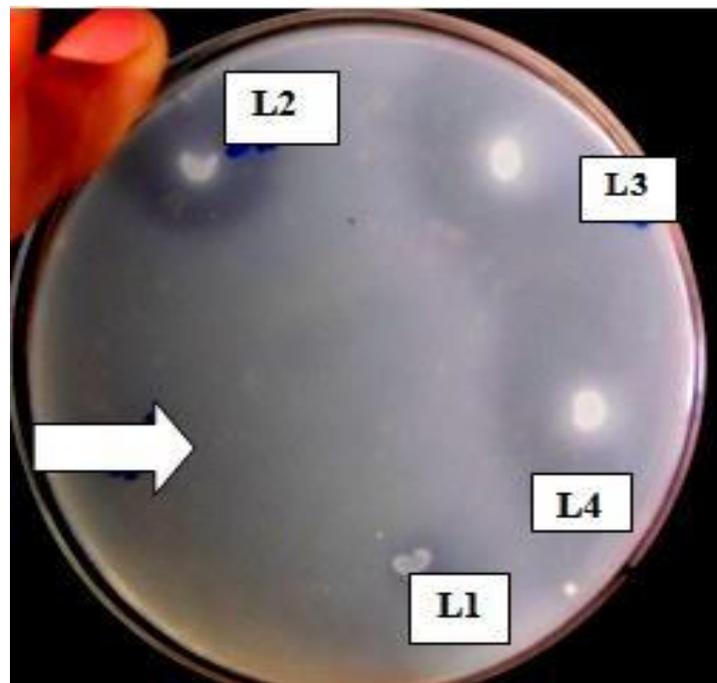


Figure 16 : L'activité protéolytique des souches de *lactobacillus*

3.3. Production des exopolysaccharides (EPS)

En ce qui concerne la détection de la production des exopolysaccharides (EPS) sur milieu gélosé à base de saccharose, la souche L4 a été sélectionnée comme productrice d'exopolysaccharides (EPS), suite à la formation de colonies larges, gluantes et très visqueuses. Des résultats similaires ont été rapportés par (Leveau et Bouix. ; 1993) (**Figure 17**)



Figure 17 : Aspect macroscopique des colonies de la souche L4 sur milieu saccharose.

Conclusion

Dans cette étude une recherche des bactéries lactiques a été effectuée dans le but de sélectionner des souches de *Lactobacillus* à potentiel technologique.

Notre travail a permis de traiter sept échantillons de lait de vache et de chèvre. Au cours de ce travail, nous avons obtenu quatre isolats bactériens de lactobacilles.

Dans un premier temps notre travail a débuté par l'isolement et la purification de 4 souches appartenant au groupe des bactéries lactiques (LAB) qui ont été affiliées au genre *Lactobacillus* sp. L'identification phénotypique des isolats a été assurée en utilisant des méthodes classiques de la microbiologie.

Les expérimentations menées dans un premier temps ont à la fois visé l'isolement et la recherche systématique de souches à potentiel technologique.

Après l'isolement, les souches de *Lactobacillus* retenues ont été identifiées par des tests physico-chimiques et microbiologiques qui conduisent à définir le genre.

Nous avons choisi d'étudier des propriétés bactériennes qui sont en priorité lors de la sélection des souches d'intérêt probiotique et technologique tels que, l'activité protéolytique, l'activité antibactérienne, production des exopolysaccharides (EPS).

D'une part les résultats suggèrent que toutes les souches de *Lactobacillus* isolés possèdent une activité protéolytique, et ont un pouvoir inhibiteur contre l'agent pathogène *E. coli* ATCC2592, d'autre part une seule souche a montré la capacité de synthétiser les exopolysaccharides.

Les résultats totaux obtenus dans cette étude révèlent que les isolats de *Lactobacillus* dans le lait de race locale (vache, chèvre) ont un potentiel technologique élevé pour être de bonnes candidates pour l'utilisation dans l'industrie alimentaire et les applications technologiques.

Perspectives

- Identification par les méthodes moléculaires des souches de *Lactobacillus* afin de définir l'espèce.
- Recherche par les méthodes ADN des gènes d'enzyme protéase.
- Identification de l'agent inhibiteur des souches.
- Recherche de certains caractères probiotiques chez les souches isolées (l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, résistance aux sels biliaires).

- Recherche et dosage de l'enzyme protéolytique par d'autres méthodes (SDS page, HPLC.)

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Accolas J.P., 1979.** Taxonomie features and identification of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Rapport présenté au groupe F.f.L./L.D.F. E44 (Laits fermentés)*, Milan, 23 juillet.
- **Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., 2000.** Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* 66(5).P: 2001-2005.
- **Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., & Chevallier, I. 2005.** Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology.* 22, 529–538.
- **Asmaa Labtar, Saliha Larouci, Amel Guermouche, Farid Bensalah., 2019** Study on molecular identification of lactic acid bacteria from fermented milks and “Smen” (a traditional steppe butter) and their enzyme producing attributes. *South Asian J Exp Biol;* 9-
- **Axelsson Lars., 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology **In** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66
- **Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F et Obert JP., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Carrieu G et Luquet FM). Tec & Doc. Lavoisier, Paris , 1-144.
- **Beijerinck, 1901.** The Integrated Taxonomic Information System. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:310
- **Bourgeois P et Larpent J.P., 1994.** Méthodes d’identification des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Loriga. pp: 141-160
- **Butel M-J., 20014.,** Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect* 44(1):1-8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002
- **Caplice E., Fitzgerald G., 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.,* 50(1-2) : 131-149
- **Cholet O., 2006.** Etude de l’écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- **Christian G., 1984.** Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin .,* 2: 185.
- **Da Cruz, A. G., Faria, J. A. F. et Van Dender, A. G. F., 2007.** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International* 40, 951-956.

Références bibliographiques

- **Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancilla, M.R., Redman, N.C., Hillier, A.J., 1995** Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Inter Dairy J, Int Dairy LAB Conference* 5:763–784.
- **Debry, G., Ayerbe, A., Bard, D. 2001.** Lait, nutrition et santé. *TEC & DOC* édition.
- **De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bacteriol*, 23, 130-135.
- **De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whiteman W.B., 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three* Springer.
- **De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994.** *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications.* London: Blackie Academic and Professional.
- **Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T et Shaha NP., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*. 86, 21-38.
- **FAO., 2003.** Lait de chamelle pour l'Afrique, Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique Niamey, Rome, 13p. Document accessible en ligne sur: <http://www.fao.org/3/aj038f.pdf>.
- **Fox, P. F., 1993.** Cheese: an overview. In *cheese: chemistry, physics and microbiology*. 1-36.
- **Guiraud, J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Agroalimetaire DUNOD, paris*. 652 pp : 282-290.
- **Gordana R.** Dimié. 2006. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* strains from fresh vegetables. *APTELEFF* 37. 1-192
- **Goursaud, J., 1985.** Le lait de vache composition et priorités physico-chimiques. in : *lait et produits laitiers vache-brebis-chèvre. (Tome 1)*. Ed. Masson, Paris, p: 25-36.
- **Hozalpfel M., du Toit, C M Franz, L M Dicks. 1998.** Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol. *International journal of food Microbiol* 3;40(1-2):93-104.
- **Jeness R., 1980.** Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science*, 63, 1605-1630.
- **Klaenhammer T.R., Fremaux C., Hechard. 1994.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques **In** *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, pp: 353-366

Références bibliographiques

- **Lister, J., 1873.** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quarterly Microbiological Sciences*. **13** 380-408.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A., Gruss A. et Le Loir Y., 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 19-28.
- **Lebeuf, Y., Michel J.C., Moineau, S. 2002.** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In: *Science et Technologie du lait*.
- **Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.
- **Lindgren, S.E ET Dobrogos, W.J., 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS. Microbiol.*, **87**:149-164.
- **Liu S., 2003.** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2): 115-131.
- **Makarova, K., Slesarev, A., Zolf, Y., 2006.,** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS*. 103:15611–16
- **Mäyrä-Mäkinen A et Bigret M. 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York, 73-102.
- **Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 512-592.
- **Mora, D, Fortina, M.G, Parin C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G. 2002.** Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 278–287.
- **Novel G., 1993.** Les bactéries lactiques In *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., Bouix M. *Tec & Doc, Lavoisier*, pp : 170-374
- **Ouwehand, A. C., Salminen, S. et Isolauri, E., 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279-289.
- **Papamaloni, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65 :859–867.

- **Pescuma, M., Hebert, E.M., Rabesona, H., Drouet, M., Choiset, Y., Haertle, T., Mozzi, F., de Valdez, G. F., J.M. Chobert., 2011.** Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine beta-lactoglobulin. *Food Chem.* 127(2):487–492.
- **Poitras, E., Houde A., 2002.** La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2: 2-11.
- **Rodriguez JM, Martínez MI, Horn N et Dodd HM., 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 101-116.
- **Rodríguez P.R., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J., 2014.** Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain. *Food Chemistry* 164: 418–426
- **Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E., 2009.** Protéolyse et autolyse de deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest algérien. *Euro J Sci Res.* 34(2):218-227.
- **Roy, D., 2006.** Innocuité Qualité et Efficacité des Probiotiques. Biotechnologies des cultures lactiques d'intérêt laitier et probiotique. AISA : Association pour les Ingrédients Santé en Alimentation.
- **Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. 2004.** Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67
- **Serhan M, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles AM, Hosri C et Fenni J., 2009.** Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26, 645-652.
- **Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D & Fischer, W., 1985** transfer of streptococcus lactis and related streptococci to the genus Lactococcus GEN ; NOV . *Syst Appl Microbiol* 6, 183 -195.
- **Soto, L.P, Frizzo, L.S, Bertozzi, E., Avataneo, E., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R., 2009.** Molecular Microbial Analysis of *Lactobacillus* Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use. *Veterinary Medicine International.* 2010: 1-5.
- **Sokol H, Bénédicte Pigneur, Laurie Watterlot, and Philippe Langella., 2008.** *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Research Article.* 105(43)16731-16736

Références bibliographiques

- **Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol*, 36: 1-29
- **StreitF., CorrieuG. And BéalC., 2008.** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* **128**:659-667.
- **Tortora, G., Derrickson, B., 2007.** Principes d'anatomie et de physiologie. Edition du Renouveau Pédagogique. Paris: De Boeck XXX-1246 p.
- **Vesa, T.H., Marteau, P., Korpela, R 2000.** Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*. 19: 165S-175S.
- **Welman, A.D., Maddox, I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 6:269–274.

Annexes

- **Milieu MRS (De Man Rogosa and Sharpe, 1960)**

Extrait de levure.....	5 g
Extrait de viande.....	10 g
Polypetone.....	10 g
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g
Glucose.....	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Mg SO ₄	0,25 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween 80.....	1 ml
Agar –Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

PH = 6,5.

Autoclave 120 C°/20 minutes.

- **Eau physiologique**

Chlorure de sodium.....	8,5 g
Peptone.....	0,5 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu GN (Gélose nutritive)**

Peptone	5 g
Extrait de viande de bœuf	4
Chlorure de sodium	5 g
Agar.....	15 g
Eau.....	1000 ml

pH = 7,2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

- **Milieu saccharosé**

Saccharose	100 g
Extrait de levure	2,5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Mg SO ₄	0,2 g
NH ₄ SO ₄	0,2 g
NaCl.....	0,6g
Eau distillée qsq.....	1000 ml
PH ajusté à	7

