

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par

BENSMINE SORIA HAFSA

&

HAMMOU YAMINA

Thème :

Identification des bactéries lactiques à propriétés probiotiques et technologiques isolés à partir de différents laits fermentés

Soutenu le 26/06/2023 devant le jury composé de :

Président	DJEBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	LABTAR Asmaa	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	SIDHOUM Warda	MCA	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement:

Nous tenons à remercier tout D'abord, le bon dieu de nous avoir donné la puissance, le courage ainsi que la volonté pour avoir réalisé ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre encadrant Mme LABTAR

ASEMAA

Pour ses conseils, son orientation et sa grande patience avec nous.

Mes vifs remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté de juger notre travail

Nous remercions très sincèrement toute personne (professeurs, ingénieurs des laboratoires, la famille,) qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail

Dédicace:

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée

La force, la volonté et la patience durant toutes mes années d'études. A mes très chers parents voici enfin le fruit de tant d'année de sacrifice et de patience,. Certes, vous ne compreniez pas grande chose à ces études qui ne finissent jamais, mais cette confiance que vous avez toujours placée en moi vous a à tout instant convaincu du sérieux du travail que j'accomplissais, Je vous suis entièrement reconnaissante pour cette inestimable compréhension,. Ce travail est avant tout le vôtre, Que Dieu vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A Mon bînôme Hafsa.

A mes chère frères Youcef et Mohamed,

A ma chère sœur Zineb

A toute ma grande famille HAMMOU et BENZIDAN,

A mes camarades de master2microbiologie appliquée
promotion 2020/2023.

YAMINA

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail

A mes chères parents pour leur soutien, leur patience, leur encouragement durant mon parcours scolaire.

A mes sœurs et mon frère ainsi à toute ma famille
BENSAMAINÉ et MARROKI.

A mes anges : BASSEM, ALI, FARESS, DINA,
OMAR.

A mon trésor NADIR

A mon binôme et sœur YAMINA.

A tous mes amis : NESRINE, KHEIRA, AICHA,

Et à l'ensemble des étudiants de master 2
microbiologie appliquée promo 2018/2023.

HAFSA

Résumé

Dans cette étude, sept souches lactiques ont été isolées à partir de deux origines (beurre traditionnelle, lait de chèvre). Après l'isolement les souches ont été caractérisées et identifiées par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques pour identifier le genre puis testés leurs aptitudes technologiques : activité aromatique et protéolytique, la capacité de produire des exopolysaccharides (EPS), et leurs propriétés probiotiques : pouvoir antibactérien contre des bactéries pathogènes : *E.coli* ATCC 2592, *S.aureu* ATCC 2593 et la résistance aux antibiotiques.

Les résultats obtenus indiquent que certaines souches présentent des aptitudes technologiques et des caractères probiotiques intéressantes: la production des exopolysaccharides (EPS), pouvoir aromatisant, pouvoir protéolytique important avec un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes utilisées, et une très bonne résistance aux antibiotiques.

Mots clés : activité protéolytique, résistance aux antibiotiques, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, EPS, activité antibactérienne

Abstract

In this study, seven lactic strains were isolated from two origins (traditional butter, goat's milk). After isolation, the strains were characterized and identified by morphological, physiological and biochemical tests to identify the genus and then tested for their technological aptitudes: aromatic and proteolytic activity, the ability to produce exopolysaccharides (EPS), and their probiotic properties: power antibacterial against pathogenic bacteria: E.coli ATCC 2592, S.aureu ATCC 2593 and resistance to antibiotics.

The results obtained indicate that certain strains have technological aptitudes and interesting probiotic characters: the production of exopolysaccharides (EPS), flavoring power, significant proteolytic power with an inhibitory power against the pathogenic germs used, and very good resistance to antibiotics.

Key words: proteolytic activity, antibiotic resistance, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, EPS, antibacterial activity

ملخص

في هذه الدراسة ، تم عزل سبع سلالات من اللاكتيك من أصلين (الزبدة التقليدية ، حليب الماعز). بعد العزل ، تم تمييز السلالات وتحديدتها من خلال الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية والكيميائية الحيوية لتحديد الجنس ثم اختبار قدراتها التكنولوجية: النشاط العطري والمحلل للبروتين ، والقدرة على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية (EPS) ، وخصائصها البروبيوتيك: قوة مضاد للجراثيم ضد البكتيريا المسببة للأمراض: الإشريكية القولونية ATCC 2592 ، S.aureu ATCC 2593 ومقاومة المضادات الحيوية.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن سلالات معينة لديها قدرات تكنولوجية وخصائص بروبيوتيك مثيرة للاهتمام: إنتاج السكريات الخارجية (EPS) ، قوة النكهة ، قوة تحلل البروتين مع قوة مثبطة ضد الجراثيم المسببة للأمراض المستخدمة ، ومقاومة جيدة جدًا للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: نشاط حال للبروتين ، مقاومة المضادات الحيوية ، لاكتوكوكوس ، لاكتوباسيلوس ، EPS ، نشاط مضاد للجراثيم

Table des matières

Remercîments

Dédicace

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

PARTIE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIE

1. Définitions.....	4
2. Historique des bactéries lactiques	4
3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques.....	5
3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	9
3.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	10
4. Ecologie des principaux genres des bactéries lactiques.....	10
5. Métabolisme des bactéries lactiques.....	11
6. Classification phylogénétique des bactéries lactiques	11
7. Beurre traditionnelle	11
8. Lait de chèvre	12
9. Composition de lait	13
10. les propriétés technologiques des bactéries lactiques	13
a. pouvoir acidifiante	13
b. Pouvoir protéolytique.....	13
c. Pouvoir aromatisant	14
d. La production des Exopolysaccharides (EPS)	14

e. Pouvoir lipolytique	14
f. Pouvoir antibactérien.....	14
11. Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique.....	16
12. Les propriétés probiotiques des bactéries lactiques	17
12.1. Suivre au cours de transit digestif, résistance aux sels biliaires, l'acidité gastrique et pepsine	18
12.2. Adhésion aux cellules intestinales et au mucus	18
12.3. Colonisation	18
13. Critères de sélection technologiques des probiotiques	20
14. Mécanisme d'action des probiotiques.....	20
15. Identification moléculaire des bactéries lactiques	22
15.1. Amplification par PCR (Reaction de Polymérisation en Chaîne).....	23
15.2. Identification par l'amplification de l'ADN 16S.....	25
15.3. Séquençage de l'ADNr16S	25
15.4. Identification moléculaire des bactéries par amplification génique.....	26

PARTIE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. L'objectif	28
2. Lieu de travail.....	28
3. Provenance des échantillons.....	28
4. Les souches de référence	29
5. Milieux de cultures	29
6. L'isolement et la purification des souches lactiques	30
7. Conservation des souches pures	30
8. Caractéristiques phénotypiques des souches	31
8.1. Examen macroscopique.....	31
8.2. Examen microscopique	31

9. Caractéristiques biochimiques des souches	32
9.1. Test de catalase	32
9.2. Croissance aux différentes températures	32
9.3. Croissance en présence de 6,5% de NaCl.....	32
10. Les propriétés technologiques et probiotiques des BL isolées	32
10.1. Activité antibactérienne des souches lactiques	32
10.2. Activité protéolytique des souches lactiques.....	33
10.3. Production de composés aromatiques	33
10.4. La production des exopolysaccharides (EPS).....	33
10.5 La résistance aux antibiotiques.....	34

PARTIE 3 :RESULTATS ET DISCUSSION
--

1. Isolement et purification	36
2. Caractéristiques phénotypique des souches.....	36
2.1. Aspect macroscopique	36
2.2. Aspect microscopique.....	38
3. caractéristiques biochimique des souches.....	39
4. les propriétés technologiques et probiotiques des Bl.....	40
4.1. Activité antibactérienne des souches lactiques	40
4.2. la résistance aux antibiotiques	44
4.3. activité protéolytique des souches.....	46
4.4. Production de composés aromatiques par souches lactiques.....	48
4.5. Production des exopolysaccharides EPS par les souches.....	49
4.5.1. Sur milieu hypersaccharosé.....	49
4.5.2. Sur milieu lait à base de rethénium	51
Conclusion.....	53
Références bibliographiques.....	55
Annexes.....	59

Liste des figures

Figure 01 : Vue microscopique d'un <i>Lactobacillus casei</i>	9
Figure 02 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques.....	12
Figure 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	21
Figure 04 : Les étapes de la PCR.....	24
Figur05 : la récupération des cellules après centrifugation.....	31
Figure 06 : Aspect macroscopique des colonies de la souche BC5.....	36
Figure 07 : Aspect macroscopique des colonies de la souche LC3.....	37
Figure 08 : Aspect macroscopique des colonies de la souche L2.....	37
Figure 09 : Aspect microscopique de la souche BC4.....	38
Figure 10 : Aspect microscopique de la souche LC5.....	38
Figure 11 : Aspect microscopique de la souche L3.....	39
Figure 12 : Aspect microscopique de la souche L2	39
Figure 13 : Culture des bactéries <i>E.coli</i> ATCC 2592 et <i>S. aureus</i> ATCC 25923 sur bouillon nutritif	40
Figure 14 : Culture des bactéries <i>E.coli</i> ATCC 2592 et <i>S. aureus</i> ATCC 25923 sur gélose nutritif	40
Figure 15 : exemple de résultat d'interaction des souches de <i>Lactobacillus</i> (BC1, L2, L3) Vis-à-vis <i>E.coli</i> ATCC 2592.....	41
Figure 16 : exemple de résultat d'interaction des souches de <i>Lactobacillus</i> (BC4, BC5, LC3) Vis-à-vis <i>E.coli</i> ATCC 2592.....	42
Figure 17 : exemple de résultat d'interaction des souches de <i>Lactobacillus</i> (BC1, L2, L3) <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	42

Figure 18 : résultat d'interaction des souches de <i>Lactococcus</i> (BC4, BC5, LC3) Vis-à-vis <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	43
Figure 19 : test antibiotique de la souche <i>Lactococcus</i> LC5.....	44
Figure 20 : Test antibiotique de la souche <i>lactococcus</i> BC4.....	44
Figure 21 : test antibiotique de la souche <i>lactococcus</i> LC3.....	45
Figure 22 : test antibiotique de la souche BC5.....	45
Figure 23 : test antibiotique de <i>lactobacillus</i> L2.....	45
Figure 24 : test antibiotique de <i>lactobacillus</i> L3.....	46
Figure 25 : exemple de résultat de l'activité protéolytique des souches de <i>Lactococcus</i> (BC5, LC5) et <i>Lactobacillus</i> BC1.....	47
Figure 26 : exemple de résultat de l'activité protéolytique des souches de <i>Lactococcus</i> (BC5, LC5) et <i>Lactobacoccus</i> (BC4, LC3).....	47
Figure 27 : production d'acétoïne par les souches lactiques.....	49
Figure 28 : production des EPS par la souche BC4.....	49
Figure 29 : production des EPS par la souche L3.....	50
Figure 30 : production des EPS par la souche L2.....	50
Figure 31 : production des EPS par la souche LC3.....	51

:

Liste des tableaux

Tableau 01 : exemples de produits fermentés	6
Tableau 02 : Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de LAB.....	11
Tableau 03 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les BL autres que lesbactériocines.....	16
Tableau 04 : Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme.....	17
Tableau 05 : exemple de produits probiotiques commerciaux et ses applications.....	19
Tableau 06 : différentes techniques moléculaires	22
Tableau 07 : Liste des antibiotiques testés.....	34
Tableau 08 : résultats de l'identification phénotypique et biochimique des souches.....	39
Tableau 09 : activité antibactérienne des souches lactiques(LAB) vis à vis <i>E. coli</i> ATCC 2592 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	43
Tableau 10 : diamètres de la zone de protéolyse des souches testées.....	48

Liste des abréviations

GRAS : Generally Recognized As Safe

LAB : bactérie lactique

LC : *lactococcus*

PCR : polymerase chain reaction

RAPD : Random Amplified DNA

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNr 16S: ARN ribosomique 16

DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis

FISH: Fluorescence in situ hybridation

qPCR: PCR quantitative

dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate

EPS : Exopolysaccharide

CO₂: dioxyde de carbone

C₄H₆O₂: Le diacétyl

G+ : Gram +

G- : Gram -

FAO : Food and Agriculture Organisation

OMS : Organisation Mondiale de la santé

PH : Potentiel hydrogène

MgCl₂: Magnesium chloride

NaCl : chlorure de sodium

H₂O: l'eau

H₂O₂ : peroxydase d'hydrogène

Lc : Lait de Chèvre

Be: beurre traditionnel

pb: paire de bases

CG : coloration de gram

MRS : de De Man,Rogosa,Sharpe

GN : Gélose nutritif

YMA : YEST MILK AGAR

VP : Voges Proskouer

KOH: Hydroxyde de potassiu

P: Pénicilline

S: Streptomycine

mm: milimètre

C°: Degré Celsuse

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) (Fox, 1992). La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis*

Les bactéries qui en responsables sont toutes groupées sous la même appellation de bactéries lactiques. (desmazeaud ; 1996). Elles sont décrites pour la première fois par Orla-Jensen (1919).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées, et sont très utilisées en industrie alimentaire, surtout laitière où elles sont impliquées dans la production de divers produits laitiers fermentés

Par ailleurs elles jouent un rôle essentiel dans la fabrication et la conservation de nombreux produits alimentaires fermentés avec leurs caractéristiques particulières telles que le goût, l'arôme et la texture (Lenoir et al, 1992).

Le genre *Lactobacillus* se compose d'un groupe génétiquement et physiologiquement diversifié de bactéries Gram positif en forme de bâtonnet, non sporulées, non pigmentées (Victor-Aduloju et al., 2018).

Les bactéries du genre *Lactococcus* sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires Il rassemble cinq espèces dont les exigences nutritionnelles sont variables (ex : *Lc. Lactis*)

Ces bactéries contribuent aussi par leurs activités enzymatiques variées, à la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur, et de la texture de plusieurs produits laitiers.

Certaines bactéries lactiques produisent des exo polysaccharides qui jouent un rôle important dans le développement de la texture de plusieurs produits laitiers (labaoui et al ; 2005).

Par ailleurs, les LAB probiotiques interviennent dans l'amélioration de la microflore intestinale et la digestion du lactose chez les individus intolérants au lactose par l'enzyme β -galactosidase (Vinderola et al., 2003).

INTRODUCTION

Les objectifs de cette étude se résument dans l'isolement des souches de bactéries lactiques à intérêt technologique et probiotique. Les isollements des LAB se sont réalisés à partir de lait cru de chèvre et de beurre traditionnel de différentes régions d'Algérie et leur caractérisation par la recherche des aptitudes technologiques et leurs activités probiotiques ainsi qu'à leur identification génotypique

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.

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 avec une discussion et une conclusion général.

Partie 1

Synthèse bibliographique

1. Définitions

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, chimio-organotrophes, qui produisent de l'acide lactique comme produit principale de leur métabolisme.

Ce sont des coques ou batonnets Gram+, immobiles, a sporulés. (Belyagoubi, 2014)

Elles ne possédant ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome-oxydase (Bougaddima et Sebaha, 2019).

Sont largement utilisées dans les procédés industrielles de fermentation agro-alimentaire, elles sont généralement reconnus comme étant sans danger **GRAS** : Generally Recognized As Safe (Luis et philippe, 2009).

Certaines de ces bactéries se multiplient bien à des températures élevées de 40°C et 44°C sont dites des bactéries thermophiles tels que *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, il ya d'autres BL peuvent se développent à des températures moyennes entre 30°C et 37°C sont dites mésophiles Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*). (Chamba , 2008 ; Carminati et *al*,2010).

2. Historique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes découverts dans des sédiments datées de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie avant les cyanobactéries. (Boudaoued et Sehaki;2021).

En 1856, Pasteur découvre des microorganismes contaminants, responsables d'un accident de fermentation de jus de betteraves dans une distillerie du Nord de la France.

Le terme bactéries lactiques (BL) a été progressivement accepté au début du XXe siècle. Elie Metchnikoff remarque que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares est liée à leur consommation de produits laitiers fermentés et suggère que certains microorganismes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine.

Synthèse bibliographique

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

Metchnikoff a isolé en 1904 le «bacille bulgare» (*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il a étudié les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il a développé l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé.

Historiquement, les premiers genres à êtres décrits sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*; les genres ci-après: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* sont considérés comme les principaux bactéries lactiques du point de vue technologique. (Kriouet et al; 2021)

3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont regroupées dans un ensemble dont le nom lui-même est évocateur de leur caractéristique métabolique principale: la production d'acide lactique. Cette

Capacité est associée à la production majeure d'énergie par fermentation des sucres mais elle confère aussi à ces espèces leur intérêt principal pour la transformation et la conservation des aliments.

Synthèse bibliographique

Tableau 01: exemples de produits fermentés ; pays d'origine et microorganismes dominant la fermentation d'après la revue (Caplice et Fitzgerald, 1999).

	Aliment fermenté	Pays d'origine	Microorganismes fermentaires	Matière première
Classe 1	Gari	Afrique de l'Ouest	. <i>Corynebacterium manihot</i> , .Bactéries lactiques (<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus</i> spp.), .Levures Bactéries lactiques, .Cephalosporium, <i>Fusarium</i> ,	Racine de manioc.
	Ogi	Nigeria et Afrique de l'Ouest	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> spp, .Saccharomyces <i>cerevisiae</i> , <i>Candida mycoderma</i> ,	Maïs.
	Tempeh	Indonésie Surinam	. <i>Candida valida</i> , <i>Candida vini</i> .Rhizopus oligosporus	Pousses de soja
Classe 2	Sauce au soja	Orient	<i>Lactobacillus</i> , <i>Tetragenococcus halophila</i> .Aspergillus <i>oryzae</i> ou <i>Aspergillus soyae</i> . .Zygosaccharomyces <i>rouxii</i>	Pousses de soja et de blé.
	Miso	Japon	<i>Aspergillus oryzae</i> , .Zygosaccharomyces <i>rouxii</i>	Pousses de soja
	Choucroute	International	bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> ,	Chou

Synthèse bibliographique

			<p><i>Lactobacillus curvatus</i>,</p> <p><i>Lactobacillus sakei</i>,</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i>)</p>	
	Fromage	International	<p>bactéries lactiques (<i>Lactococcus lactis</i>,</p> <p><i>Streptococcus thermophilus</i>,</p> <p><i>Lactobacillus bulgaricus</i>,</p> <p><i>Propionibacterium shermanii</i>),</p>	Lait
	Idli	Inde		
	Olives	Méditerranéen	<p>Bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>),</p> <p><i>Torulopsis</i>, <i>Candida</i>,</p> <p><i>Trichosporon pullulans</i></p>	Riz et poisson
	Pickles			
	Saucisses fermentées	International	<p>bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>),</p> <p>bactéries lactiques (<i>Pediococcus cerevisiae</i>,</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i>)</p> <p>bactéries lactiques (Lactobacilles et Pediocoques),</p> <p>Coques catalase positive (<i>Staphylococcus carnosus</i>, <i>Staphylococcus xylosus</i>, <i>Micrococcus varians</i>),</p> <p>occasionnellement des champignons et/ou des levures</p>	Olives vertes Concombre

Synthèse bibliographique

Classe 4	Bière	International	* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyce, Carlbergensis</i>	Malt, houblon
	Vin	International	*bactéries lactiques (<i>Leuconostoc, Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus, Oenococcus</i> , <i>Streptococcus</i>), * <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> , <i>Saccharomyces oviformis</i> , <i>Torulospora rosei</i>	Baies de raisin
Classe 5	Cidre	International	* <i>Lactobacillus</i> hétérofermentaires, * <i>Kloeckera</i> spp, <i>Saccharomyces</i> <i>uvarium</i> ,	
	Vinaigre de vin	International	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> , * <i>Acetobacter, Gluconobacter</i>	
Classe 6	Dawa-dawa	Nigeria	<i>Bacillus</i> spp.	Graines de Caroubier
	Natto	Japon	<i>Bacillus subtilis</i>	Pousses de soja
	Pain	International	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Farine de blé
	Pains spéciaux	International	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exigus</i>	Farines de différentes cereals

3.1. 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, 1993 ; Felis et Dellaglio, 2007).

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins. La formation de chaîne de cellules et courante (De Vos, 2009). **la figure 01** montre l'aspect microscopique d'une souche d'un *Lactobacillus casei*.

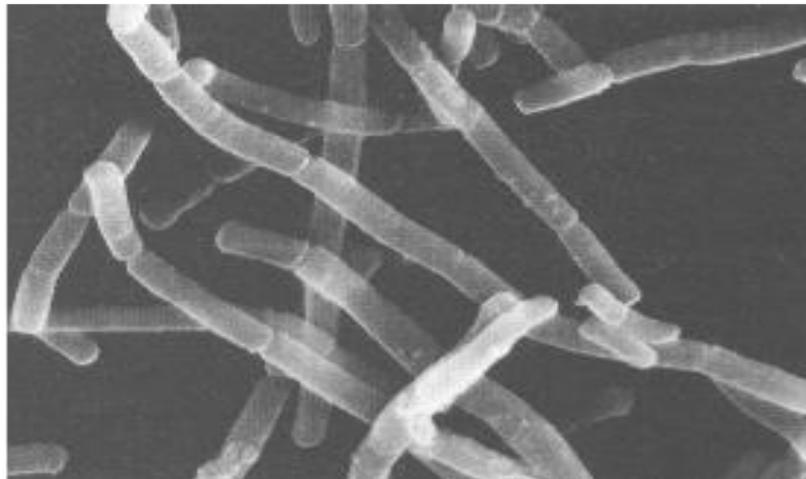


Figure 01 : Vue microscopique d'un *Lactobacillus casei* (Gx4000) (Leveau, 1993)

Les lactobacilles représentent un genre important des LAB tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale intestinale.

Ce genre est très hétérogène, aussi bien sur le plan génétique que sur le plan des habitats colonisés. La grande diversité d'habitats explique que les lactobacilles sont utilisés pour la production de nombreux produits fermentés traditionnels.

Ils sont notamment utilisés pour les fermentations lactiques du lait (*L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*), de la viande (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*) ou de produits végétaux (*L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*, *L. fermentum*).

3.2. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques sont des bactéries à gram positif, nonsporulées de la famille des *Streptococcaceae*. Ils se présentent sous la forme de diplocoques ou coques en chainettes

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lc. lactis* est l'espèce la plus connue (Pot, 2008)

4. Ecologie des principaux genres des bactéries lactiques

Les BL occupent plusieurs milieux naturels, des végétaux, des animaux et des produits alimentaires (produits laitiers.....).

Aussi elles font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine.

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital

chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène (*Bougaddima et Sebaha, 2019*).

Les espèces du genre *Lactococcus* (*Lc*) peuvent être isolées du lait et des végétaux fermentés (maïs, haricot, choux, laitue, pois, trèfle, pomme de terre et concombre), qui sont leur réservoir naturel.

Les espèces du genre *Lactobacillus* se présentent dans des différents milieux : le lait et le fromage (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paraasei* *Lactobacillus curvatus*), le lait fermenté (*Lactobacillus Kéfir*), les produits végétaux fermentés, les marinades, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus buchneri* et *Lactobacillus sanfrancisco*). (*Djermane, 2019*).

5. Métabolisme des bactéries lactiques

Les LAB peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique) telles que *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et quelques *Lactobacillus*, hétérofermentaire facultatif (production d'acide lactique ou d'acide lactique et d'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (production d'acide lactique, d'acide acétique ou d'éthanol et de CO₂) telles que *Leuconostoc* et *Weissella* (Vandamme *et al.*, 1996).

Tableau 02 : Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de LAB (Kandler, 1983 ; Corrieu et Luquet, 2008).

Genre	Voie fermentaire	Produits majoritaires (ratio molaire)	Configuration du lactate produit
<i>Streptococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	L (+)
<i>Lactococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	L (+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentaire	Lactate	D(-), L(+), DL
<i>Leuconostoc</i>	Hétérofermentaire	Lactate : Acétate : CO ₂ (1:1:1)	D(-)
<i>Bifidobacterium</i>	Hétérofermentaire	Lactate : Acétate (2 : 3)	L(+)

6. Classification phylogénétique des bactéries lactiques

Sont (RAPD-PCR, ribotyping) ou d'autres techniques semblables. Elle permet une nouvelle approche phylogénétique. Le génome des bactéries lactiques varie selon le genre et selon l'espèce (1 à 5 millions de paires de base). Cette variabilité peut servir pour différencier les groupes bactériens. L'ARNr 16S est utile à la classification phylogénétique et à l'identification bactérienne puisqu'il est présent chez toutes les bactéries (Zergoug ;2017).

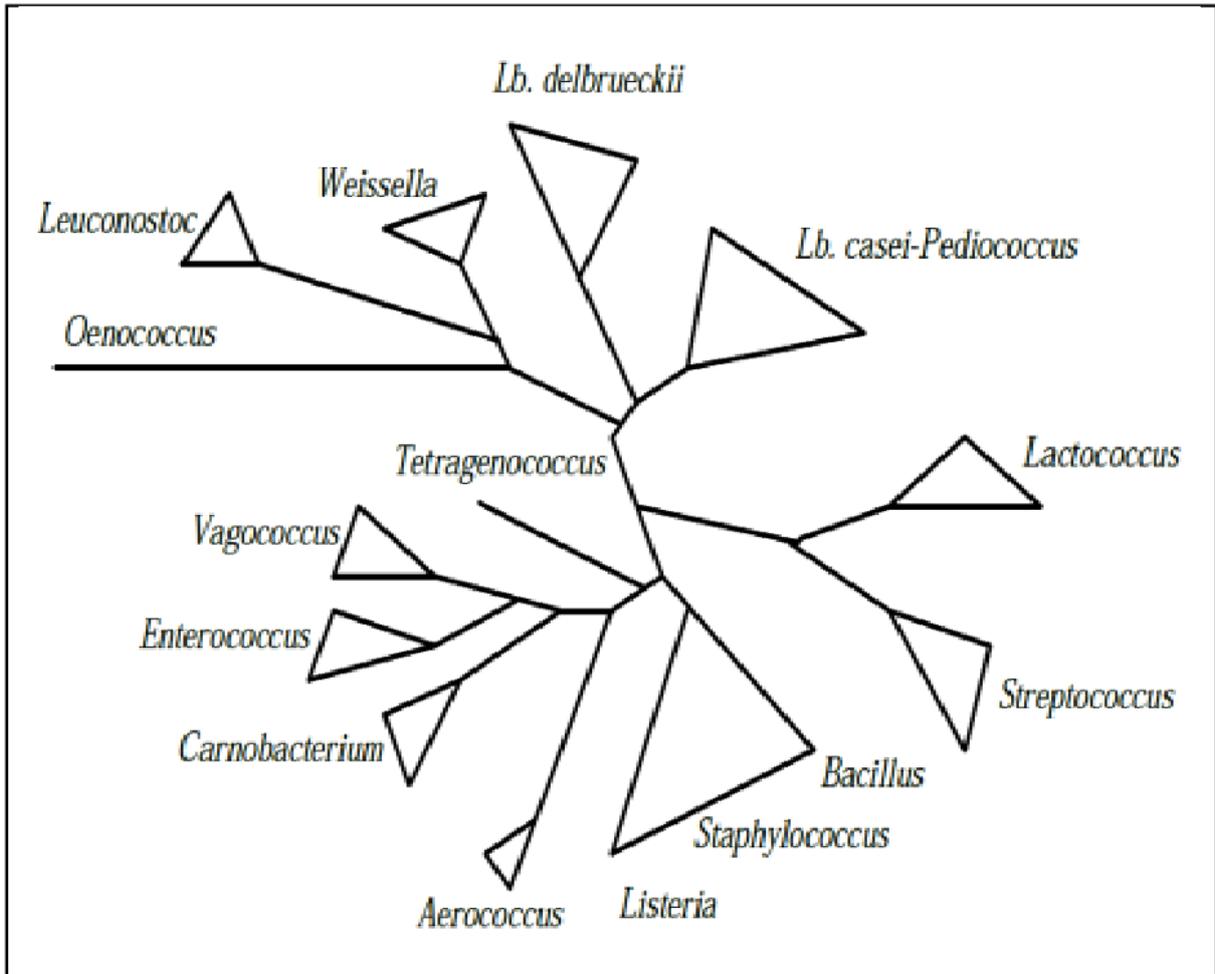


Figure 02 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Lahtinen et al., 2012).

7. Beurre traditionnelle

Est un produit laitier utilisé depuis des siècles, fabriqué par le battage de la crème du lait de vache, la berbis ou la chèvre.

8. Lait de chèvre

Est le lait que produit la femelle de la Chèvre domestique (*Capra hircus hircus*) et qui est généralement consommé par les chevreaux. Moins utilisé en alimentation humaine que le lait de vache.

9. Composition de lait

Le lait contient plus de 88% d'eau.

Les macronutriments du lait entier se répartissent comme suit :

43% de glucides, son principal glucide est le lactose, 29 % de lipides, ses lipides comportent une majorité d'acides gras saturés et de cholestérol, 28% de protéines.

Le lait est source de calcium et de phosphore : 100 g (environ 100 ml) couvrent plus de 10 % de l'apport nutritionnel conseillé par jour pour un adulte en calcium et phosphore. Il contient aussi des vitamines B12, B2, B3 ou PP, B5, A, C et D.

Une portion de 100 g (environ 100 ml) apporte :

Près de 12 % des apports nutritionnels conseillés en vitamine B12 ;

Environ 10 % des apports conseillés en vitamines B2 et B3 (ou PP) ;

Près de 5% des apports journaliers conseillés en vitamines A, B5 et D. Il est parfois enrichi en vitamines.

10. Les propriétés technologiques des bactéries lactiques

a. pouvoir acidifiante

L'activité acidifiante est le caractère le plus recherché des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire, c'est la conversion des sucres en acide lactique durant la multiplication bactérienne (Mayra et al ; 2004).

Le pouvoir d'acidification de ces bactéries varie en fonction de l'activité de l'eau (AW) et la durée de stockage des bactéries à des températures ambiantes (Declomesnil ; 2014).

b. Pouvoir protéolytique

Cette activité est basée sur la dégradation des protéines en peptides courts qui sont ensuite transportées à l'intérieur de la cellule ou elles subiront une hydrolyse jusqu'à l'étape acides aminés par des enzymes protéolytiques présentes dans la cellule elle-même (Azizi ; 2010).

c. Pouvoir aromatisant

Les bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats tels que : du lactose, citrate, les acides aminés..., qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (*Cholet ; 2006*).

Par exemple : *Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paraasei*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*

Les *Leuconostocs* hétérofermentaires sont souvent associés aux lactocoques dans la production de composés aromatiques comme : l'éthanol, acétone, diacétyl.... (*Mahaut et al ; 2000*).

d. La production des Exopolysaccharides (EPS)

La production d'exopolysaccharides (EPS), par les LB est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (*Walling et al ; 2001*).

Il existe trois groupes des EPS synthétisés par les BL : certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, d'autres appartiennent à la composition de la paroi cellulaire, et le dernier groupe d'EPS est sécrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le nom exopolysaccharides (*Topisirovic et al; 2006*).

Ils ont la capacité de protéger les BL contre certaines conditions défavorables, la production de ces substances est associée à la croissance bactérienne. (*Broadbent et al; 2003*)

e. Pouvoir lipolytique

Les BL sont considérées comme faiblement lipolytiques (*Roissart et Luquet ; 1994*), l'activité lipolytique des BL a un avantage important dans la production des substances aromatiques des produits transformés, mais parfois elle soit l'origine de nombreuses altérations (*Franz et al ; 2003*).

f. Pouvoir antibactérien

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes (*Dortu et Thonart ; 2008*), tels que :

L'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, Le dioxyde de carbone, Le diacétyl, La reutéline et les bactériocines (*Leveau et al, 1991 ; Klaenhammer et al, 1994 ; Vuyst et al, 2007*).

i. Les bactériocine

Sont des peptides antimicrobiennes de faibles poids moléculaires, elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice, la plupart ont une activité contre les pathogènes des aliments tels que *Listeria monocytogenes*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* (Dortu et Thonart ; 2008).

ii. Les acides organiques

Les BL produisent des acides organiques au cours de la fermentation, les principaux acides produits sont : lactate, acétate et propionate. Ces acides permettent l'inhibition de la croissance des microorganismes qui ne peuvent pas croître à pH acide (Mami ; 2013).

iii. Le dioxyde de carbone CO₂

Produit durant la fermentation hétéro-lactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies, l'activité antifongique du CO₂ est due à l'inhibition des décarboxylations enzymatiques et à son accumulation dans la bicouche lipidique membranaire entraînant un dysfonctionnement (Suskovic et *al* ; 2010).

iv. Le diacétyl C₄H₆O₂

Le diacétyle est un composé aromatique produit par les BL pendant la fermentation du citrate (Leonard ; 2013), en 1958, Christensen et Pederson ont montré que les espèces homofermentaires produisaient le C₄H₂O₆ plus rapidement avec des quantités importantes que les espèces hétérofermentaires, joue un rôle dans le contrôle de la croissance des contaminants, avec d'autres métabolites antimicrobiens des bactéries lactiques (Suskovic et *al* ; 2010).

v. Le reutéline

Produit durant la fermentation du glycérol, elle est produite par quelques souches des BL, cette produit inhibe la croissance des bactéries par l'inhibition de synthèse d'ADN (Dobrogosz et *al* ; 1989).

Synthèse bibliographique

Tableau 03: Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les BL autres que les bactériocines (Suskovic et *al* ; 2010).

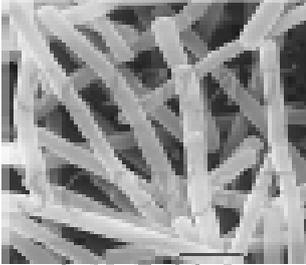
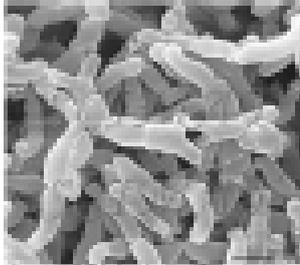
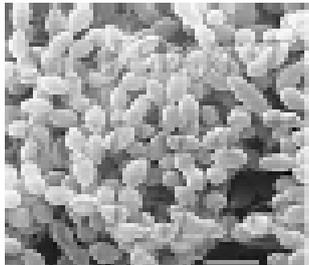
Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acide lactique	Toutes les BL	Levures et bactéries G+
Acide acétique	BL hétérofermentaires	Levures et bactéries G+
Diacétyle	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Levure et bactéries G+
H ₂ O ₂	Toutes les BL	Levures, bactéries G+
CO ₂	BL hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de microorganismes
Reutéline	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Champignons, protozoaires et bactéries G+

11. Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique

Les genres microbiens les plus utilisées comme probiotiques en alimentation humaine sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Tableau 04**). Par contre en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Probionibacterium*, *Sacharomyces*, *Aspergillus* et *Torilopsis* (Tannock, 1997).

Synthèse bibliographique

Tableau 04 : Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme
(Piquepaille, 2013 ; Izquierdo, 2009)

Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques
 <p style="font-size: small; text-align: center;">Lactobacillus delbrueckii</p>	 <p style="font-size: small; text-align: center;">Bifidobacterium breve</p>	 <p style="font-size: small; text-align: center;">Streptococcus thermophilus</p>
<ul style="list-style-type: none"> L. acidophilus La5 (Chr. Hansen) L. acidophilus NCFM (Danisco) L. casei Shirota (Nestlé) L. casei DN-114 001 (Danone) L. reuteri ATCC 65736 (Biogate) L. delbrueckii subsp. bulgaricus 2038 (M&S Milk) L. gasseri KT (M&S) L. johnsonii La1 (Hera) L. paracasei CRL431 (Chr. Hansen) L. paracasei F19 (Medipharm) L. plantarum 2997 (Food All) L. rhamnosus GG (Nestlé) L. crispatus L. gallinarum 	<ul style="list-style-type: none"> B. longum BB536 (Morinaga) B. breve Yakult (Nestlé) B. lactis Bb 12 (Chr. Hansen) B. lactis HN019 (Danisco) B. animalis DMI 73010 (Danone) B. infantis 35264 (Procter & Gamble) 	<ul style="list-style-type: none"> S. thermophilus 1131 (M&S Milk) E. faecalis Symbioflor (Symbioflora) E. faecium SP68 (Danisco) P. acidilactici Bactocell® (Lallemand)

12. Les propriétés probiotiques des bactéries lactiques

En 2001 l'FAO et OMS ont définis les probiotiques comme suit :

Les probiotiques sont donc définis comme des « **microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte** ».

Parmi les micro-organismes les plus couramment reconnus comme probiotiques figurent les bactéries appartenant principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, *Lactococcus*, ces bactéries sont largement utilisés comme additifs des les aliments, Pour survivre et coloniser le tractus intestinal les bactéries probiotiques possèdent une capacité d'adhérer à la surface intestinale, une grande résistance au pH acide et aux sels biliaries

(Louembe et al ; 2005).

Il existe certains caractères spéciales des BL pour qu'on peut les classer comme probiotiques :

12.1. Suivre au cours de transit digestif, résistance aux sels biliaires, l'acidité gastrique et pepsine

Environ 2,5 litres de suc gastrique à un pH d'environ 2 (très acide) sont sécrétées chaque jour dans l'estomac, ce qui entraîne la destruction de la plupart des micro-organismes ingérés. Donc les probiotiques doivent avoir une tolérance élevée à l'acidité gastrique. (Vinderola et Reinheimer, 2003).

La bile est un liquide qui facilite la digestion des graisses se compose du cholestérol, sels biliaires et des substances éliminées par le foie,

Plusieurs études ont montré que les probiotiques peuvent résister à ces conditions,

En 2005, Louembe et al ; ont montré que il existe des BL peuvent croître in vitro en milieu très acide **pH=2**, et en présence des sels biliaires et les enzymes gastrique durant au moins 4h, autres BL comme *L.bulgaricus* et des souches de bifidobacterium ne résistent pas au-delà d'une heure dans des conditions pareils.

12.2. Adhésion aux cellules intestinales et au mucus

Une bonne adhésion du probiotiques représente sa capacité à se fixer aux cellules de l'intestin, si l'adhésion est satisfaisante, le temps de présence des souches probiotiques sera augmenté, cela empêche l'adhésion des autres bactéries pathogènes. 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).

12.3. Colonisation

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

Une consommation régulière de probiotiques semble donc indispensable pour obtenir un effet bénéfique persistant (Roy ; 2006).

Synthèse bibliographique

Tableau 05: exemple de produits probiotiques commerciaux et ses applications ((Hozalpfel *et al.*, 1998).

Produit	Souche	Effet revendiqué
Activia® (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173010	-Aide à régulier le transit.
Actimel® (Danone)	<i>Lactobacillus casei</i> DN114001	-Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>L. Casei</i> Shirota	-Régule le transit et renforce les défenses naturelles.
BION®3(Merck)	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> +vitamines+minéraux	BION®3(Merck)
BION®Transit (Merck)	<i>L..plantarum</i> 299V	BION®Transit (Merck)
BION®Voyage (Merck)	Probio-Tec® Quatro : <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium latis</i> BB-12 <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 <i>Lactobacillus delbruekii</i> LBY-27	BION®Voyage (Merck)

Synthèse bibliographique

BION® Flore intime (Merck)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactococcus reuteri</i> RC14	-Restaure et protège l'équilibre de votre flore vaginale
VSL#®	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus bugaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	-Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéreuse et de la pouchite
Lacteol® (Axcan pharma)	<i>L. acidophilus</i>	-Evite la diarrhée
Ulat-Levure®	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-Evite la diarrhée
Gefilus® (Valio)	<i>L. rhamnosus</i> GG	-Renforce les défenses naturelles de l'organisme,

13. Critères de sélection technologiques des probiotiques

- Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.
- Conservation des propriétés probiotiques après production.
- Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini

14. Mécanisme d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et souche-dépendants. En effet, ces bactéries participent au maintien de l'homéostasie du microbiote.

L'une de leurs particularités est de stabiliser ou remodeler le microbiote en réponse à un stress spécifique, en favorisant, par exemple, le retour à une communauté microbienne de base suite à un événement perturbateur comme un traitement par des antibiotiques (Preidis et Versalovic, 2009). L'effet des bactéries probiotiques est amplifié par l'apport de prébiotiques (fructooligosaccharides ou oligo-fructose) par l'alimentation. Un prébiotique étant un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte l'hôte positivement en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité d'une bactérie ou d'un nombre réduit de bactéries

Synthèse bibliographique

dans le côlon(**Figure 03**)

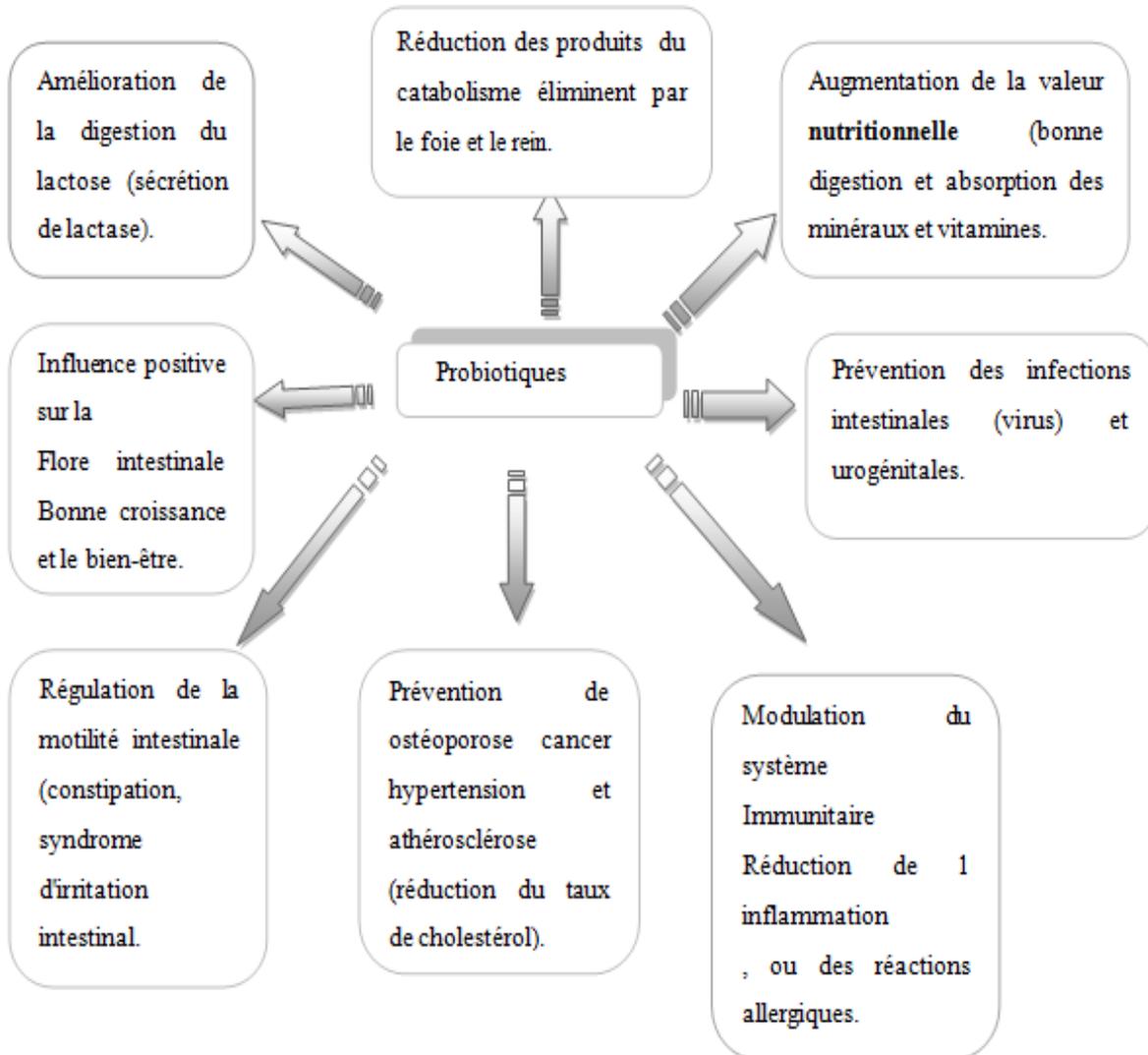


Figure 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Mercenier *et al.*, 2002)

15. Identification moléculaire des bactéries lactiques

L'identification phénotypique des bactéries lactiques (étude morphologique, les tests biochimiques...) semblent moins fiables, ce qui a fait appel aux méthodes d'identification génotypique, Il existe différents techniques moléculaires sont utilisées (Riquet et Pitel ; 2000

Tableau 06 : différentes techniques moléculaires (2012)

Technique	Principe	Objectif
FISH	Marquage fluorescent de l'ARNr	Identification moléculaire et répartition spatiale des micro-organismes
PCR	Copie d'un fragment d'ADN cible in vitro	Amplification de l'ADN
DGGE	Électrophorèse en gradient de dénaturan	Etude de la biodiversité des micro-organismes
qPCR	Amplification quantitative de l'ADN	Quantification des micro-organismes
Séquençage	Lecture de l'information génétique	Identification moléculaire des micro-organismes

15.1. Amplification par PCR (Reaction de Polymérisation en Chaîne)

La technique plus utilisée aujourd'hui est la PCR en temps réel (qPCR) ou PCR quantitative, technique précise, rapide et facilement automatisable, c'est une révolution dans l'utilisation de la PCR, cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives, elle nécessite des thermocycleurs particuliers, Taq polymérase, dNTPs, amorces, MgCl₂, H₂O, sondes fluorescentes plus l'ADN à amplifier

Les principales étapes du 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 oligo-nucléotides présents dans le milieu de réaction.

Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir estimer la taille des produits d'amplification.

Synthèse bibliographique

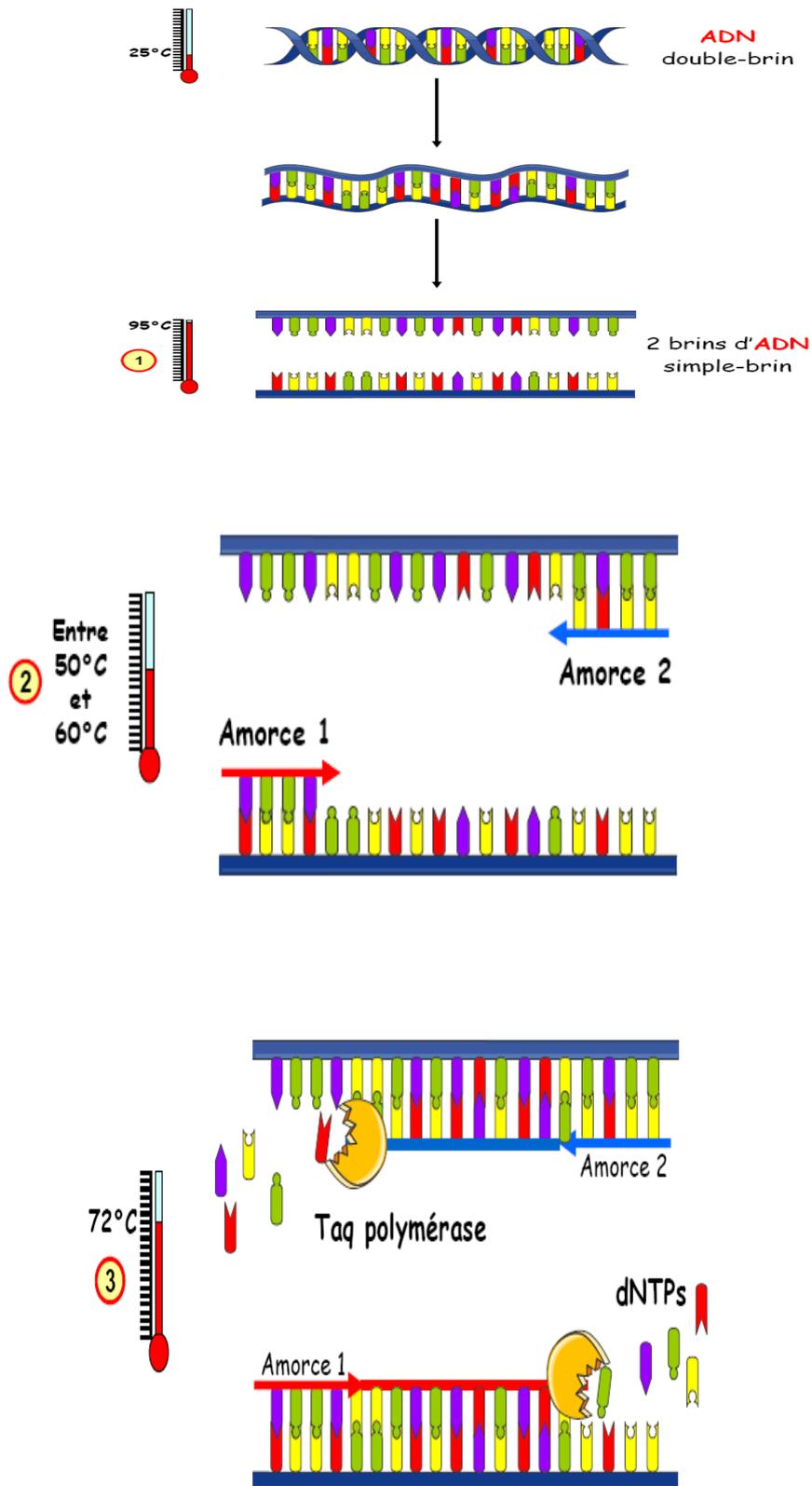


Figure 04 : Les étapes de la PCR

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

L'identification des isolats bactériens a été entreprise 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.

15.3. Séquençage de l'ADNr16S

L'histoire du séquençage a débuté dans la deuxième moitié des années 1970 avec l'invention de deux méthodes développées par (Maxam et Gilbert, 1977) et (Sanger *et al.*, 1977). L'approche de Sanger est basée sur une synthèse enzymatique, tandis que celle de Maxam et Gilbert repose sur le marquage radioactif de fragment coupé de façon sélectif.

Le séquençage direct de l'ARNr 16S soit fiable et permet l'identification d'une souche inconnue en une seule étape, son utilisation est limitée du fait que certaines espèces qui diffèrent entre elles peuvent partager la même séquence d'ADNr 16S.

Le séquençage de gène est aujourd'hui une technique partiellement automatisé permettant de lire rapidement des séquences relativement longues par rapport à celles autorisées par la méthode traditionnelle de Sanger

➤ Le principe

Le fragment d'ADN à séquencer est obtenu par PCR ensuite mis en présence dans un milieu réactionnel contenant :

- L'amorce à partir de laquelle la synthèse du néobrin sera réalisée (par une ADN polymérase)
- Les 4 désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG).
- Les 4 didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct.
- ADN polymérase (Taq polymérase).

Dans le milieu de réactionnel, les dNTP sont en grande quantité et les ddNTP en faible nombre. Lorsque l'ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, la synthèse du brin s'arrête. L'incorporation aléatoire de ddNTP permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille variable. Les ddNTP sont incorporés, marqués par 4 fluorochromes différents

Synthèse bibliographique

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un desoxynucléotide ou un didésoxynucléotide.

Les fragments d'ADN obtenus sont de longueurs différentes ; le séquenceur sépare les fragments d'ADN selon leur taille par chromatographie.

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées par les programmes « BlastN » afin de rechercher les pourcentages d'identité avec différentes séquences présentes dans les banques de données, via le site NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>).

Il convient de séquencer au moins 500 à 525 bp, idéalement 1300 à 1500 bp. Les séquences traitées ont été comparées à des bases de données pour permettre l'identification des souches de bactéries lactiques (LAB) par le logiciel NCBI/BLAST (National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool) via le site internet (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Le logiciel Blast permet de comparer une séquence nucléique ou protéique, dite requête à une banque de séquences, nucléiques les plus proches au sein de la banque de GenBank afin de rechercher les pourcentages d'identité (Benson *et al.*, 1999)

L'alignement des séquences permet, donc, de trouver des similarités entre les séquences analysées. Ces similarités sont dues à une origine évolutive commune (homologie) ou à des fonctions semblables comme il est possible via ce site de comparer des séquences avec celles présentent dans la banque de donnée.

15.4. Identification moléculaire des bactéries par amplification génique

C'est une méthode génotypique à base de PCR permettant l'identification directe de locus spécifiques d'ADN des bactéries au niveau du genre et espèce (Jackson *et al.*, 2004), à l'exemple des gènes de ménages.

PARTIE 2

Matériel et Méthodes

1. l'objectif

Le but de notre étude consiste : D'abord d'isoler des BL à partir des différents laits fermentés (lait de chèvre, beurre traditionnel), puis les identifie morphologiquement (forme, taille, CG), et par les tests biochimiques (tests de catalase, croissance aux différentes températures, pH). Ensuite, l'étude de quelques activités technologiques, et caractères probiotiques des BL isolés.

2. Lieu de travail

Le travail à été réalisé au sein de laboratoires pédagogiques de l'université des sciences de la nature et de la vie SNV Abdelhamid Ibn Badis –Mostaganem-.

3. L'origine des échantillons

Sept échantillons de lait de chèvre et deux échantillons du beurre traditionnel de différentes régions d'Algérie ont été utilisés pour réaliser cette étude,

	Appellation	La nature	Lieu	La date de prélèvement
1	Be	Beurre traditionnel	Mostaganem (Ouled hammou)	22/1/2023
1	LC1	Lait de chèvre	Mostaganem (Belhadri)	25/4/2023
1	LC2	Lait de chèvre	Mostaganem (Souafliya)	26/4/2023

1	LC3	Lait de chèvre	Mostaganem (Sidi Ali)	3/5/2023
1	LC4	Lait de chèvre	Mostaganem (Mazagran)	5/5/2023
1	LC5	Lait de chèvre	Mostaganem (Ouled hammou)	6/5/2023
1	L2	Lait de chèvre	Béchar	5/ 4/2023
1	L3	Beurre traditionnel	Tiaret	24/4/2023

4. les souches de références

Nous avons utilisées deux souches pathogènes pour l'indication de l'activité antibactérienne des souches lactiques.

5. Milieux de cultures

Différents milieux de cultures ont été utilisés :

MRS (De Man, Rogosa et al., 1960): pour l'isolement et la culture des souches de lactobacilles.

M17 (Terzaghi et al., 1975) : pour l'isolement et la culture purification des souches de lactocoques .

Gélose nutritif (GN) : pour la culture des bactéries pathogènes.

Clark et Lubs : pour l'activité aromatisante des BL.

Milieu YMA (YEST MILK AGAR) : la recherche de l'activité protéolytique des souches isolées.

MRS additionner 10% saccharose : pour la recherche des souches productrices des EPS.

6. l'isolement et la purification des souches

Une fois la fermentation du lait est faite, une série de dilution à été réalisé : 1ml de la solution mère (lait fermenté) dans 9 ml d'eau physiologique (10^{-1} jusqu'à la dilution 10^{-7})

Puis, 0,1 ml des trois derniers dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} a été étaler sur gélose MRS, et les incubés dans l'anaérobiose à 37°C pendant 48h.

La purification est réalisé par des repiquages successifs sur MRS solide avec l'incubation dans l'anaérobiose à 37°C pendant 48h, jusqu'à l'obtention des colonies pures (meme taille, forme, couleur).

7. Conservation des souches

A partir de jeunes cultures (48h à 72h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 12000 tours/min pendant 20 min à 4°C .

Les surnagants sont jetés puis les culots récupérés ensuite additionnés avec le milieu de conservation ; MRS additionné à 20 ml de glycérol.

Les cultures des souches ont été conservées en tubes eppendorfs à -20°C

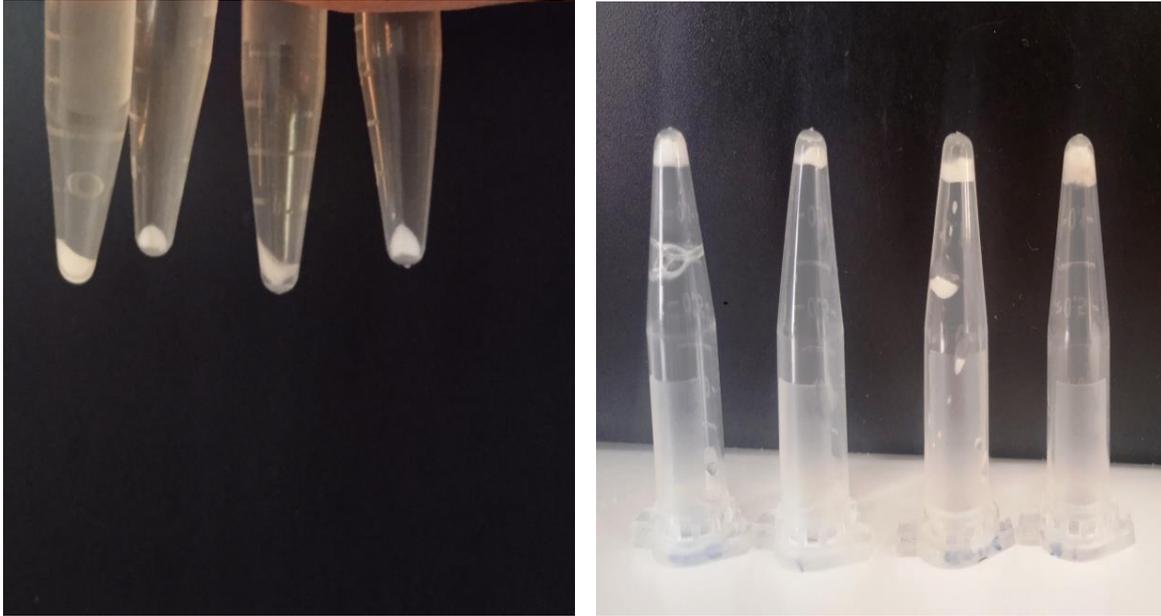


Figure 05 : la récupération des cellules après centrifugation

8. Caractéristiques phénotypique des souches

8.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet d'observer et de décrire l'aspect morphologique : taille, forme, contour, couleur, des colonies obtenues sur milieu MRS solide.

8.2. Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement ($\text{Gr} \times 100$) nous permet de classer les bactéries selon : le Gram, la forme, et le mode de regroupement (Mami ; 2012).

Ce test est réaliser sur des frottis qui sont ensuite colorés avec une coloration différentielle (coloration de Gram), cette coloration nous permet de différencier les Gram+ des Gram.

9. Caractéristiques biochimiques des souches

9.1. Test de catalase

La catalase est une protéine existe chez la totalité des êtres vivants ya compris les bactéries, elle permet d'accélérer la réaction de destruction de eau oxygéné H_2O_2 , selon la réaction suivante :



9.2. Croissance a différentes températures

Les bactéries ont étéensemencées et incubées en milieux MRS et M17 bouillon à différentes températures 44°C, 37°C, pendant 24h-72h. (Carr et *al* ; 2002).

9.3. Croissance en présence de 6,5% de NaCl

Ce test est réalisé dans le milieu MRS et M17 bouillon additionné de 6,5% de NaCl, les résultats sont observés après 24 H à 48H d'incubation à 37°C. La présence de troubles dans les tubes indique la croissance (*Guiraud, 1998*).

10. Les propriétés technologiques et probiotiques des BL isolées

10.1. Activité antibactérienne des souches lactiques

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

Les souches indicatrices *E.coli* ATCC 2592, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été cultivé dans des boites puis dans des bouillons nutritifs à 37 °C pendant 24h. Les cultures ont étéensemencés sur les boites de pétri contenant MRS et M17 a l'aide d'un écouvillon stérile. Ensuite les boites ont été séchées pendant 15 min, puis utilisées pour le test de sensibilité.

30 µl de cultures jeune de 24h-72 h est ajouté à des disques stériles en papier et placés sur la surface de l'agar MRS étalé par les souches pathogènes.

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. (Rubio et al ; 2014).

10.2. Activité protéolytique des souches lactiques

L'activité protéolytique des différentes souches est recherchée sur milieu YMA (Yeast Milk Agar).

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées sur milieu MRS bouillon et incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures, Des disques stériles ont été imprégnés a 10 µl de chaque suspension que l'on dépose à la surface des boites de pétri contenant du milieu YMA, on laisse les boites séchées, puis on les incube à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats est effectuée par l'observation des halos clairs autour des disques, le diamètre de la zone claire entourant les disques a été déterminé (mm). L'intensité de la réponse est notée à chaque fois (-, +, ++).

10.3. Production de composés aromatiques

La production d'acétoïne est testé sur milieu Clark et Lubs. Les souches sont cultivées sur ce milieu, après 24 h d'incubation on test par la réaction de Voges-Proskauer dite réaction (VP). (Avril et al ; 1992)

2 ml de cette culture sont transvasés a 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillé (VP₁) et 0,5 ml de réaction α -naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP₂).

On laisse au repos 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rouge à la surface du milieu.

10.4. La production des exopolysaccharides (EPS)

Ce test permet la détection des colonies larges et gluantes sur gélose MRS hypersaccharosée (additionné de 10% du saccharose).

Les souches à tester sontensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48h.

La production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges

et gluantes (Leveau *et al* ; 1991).

10.5. La résistance aux antibiotiques

Les souches ont été cultivées dans bouillon MRS et M17 et incubées à 37°C pendant 18h puis étalées sur la gélose MRS. Des disques d'antibiotiques ont été placés sur gélose et incubés pendant 24 heures à 37°C. Les antibiotiques ont été placés sur gélose et incubés pendant 24 heures à 37°C. Les antibiotiques inclus sont détaillés au tableau.

Les zones inhibitrices émergent après 24h d'incubation ont été mesurées. L'activité a été évaluée comme étant sensible, S ($\geq 21\text{mm}$) ; I (16-20mm) et R ($\leq 15\text{mm}$) comme décrit précédemment par (Liasi *et al* ; 2009)

Tableau 07 : Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Charge de disque (μg)	Symbole
Pénicilline G	10	P
Streptomycine	25	S

Partie 3

Résultats et discussion

1. Isolement et purification

Dans notre étude les isolats de bactéries lactiques (LAB) ont été obtenus à partir de quinze échantillons collectés de lait cru de chèvre et beurre traditionnel. On a ciblé l'isolement de LAB mésophiles (lactocoques et lactobacilles). Les bactéries à Gram positif et catalase négative sont sélectionnées lors de cette étude. Au total sept isolats de LAB ont été sélectionnés. Quatre coques et trois lactobacilles et ont été utilisés pour la caractérisation biochimique comme le montre le **tableau 08**

2. Caractéristiques phénotypique des souches

2.1. Aspect macroscopique

Les colonies de lactocoques développées sur milieu solide M17 sont visqueuses blanchâtres, et de forme aplaties (**Figures : 06, 07**)

Les colonies de lactobacilles mésophiles développées sur milieu MRS solide sont moyennes avec un pourtour irrégulier (**figure 08**)

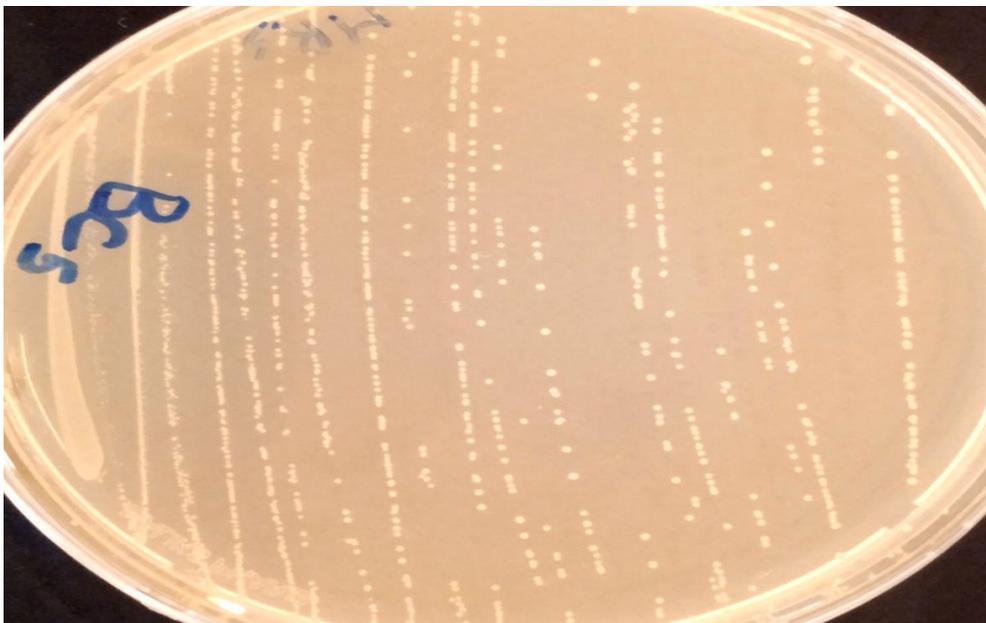


Figure 06: Aspect macroscopique des colonies de la souche BC5

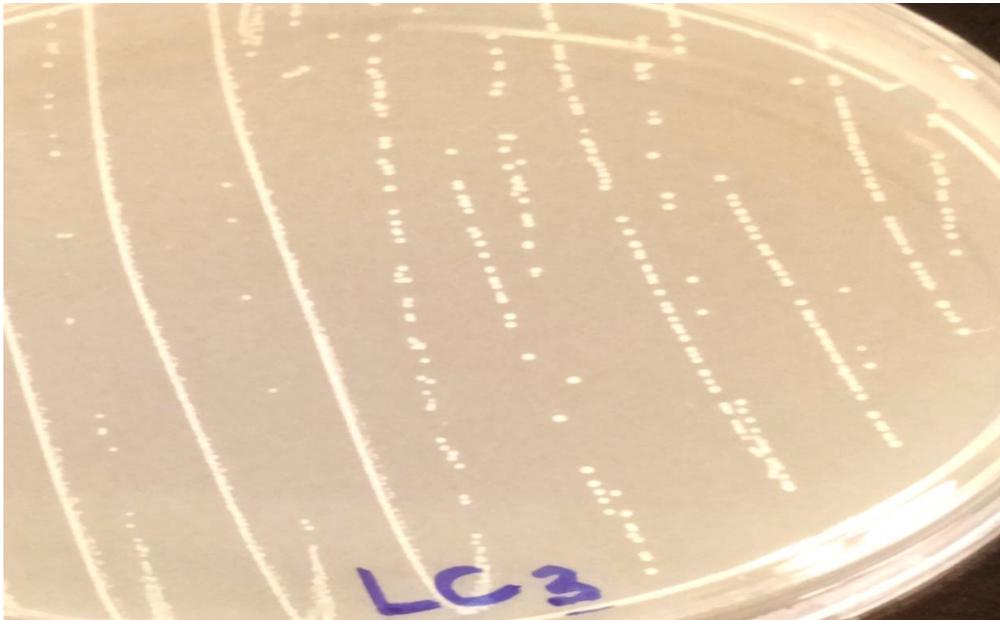


Figure 07: Aspect macroscopique des colonies de la souche LC3

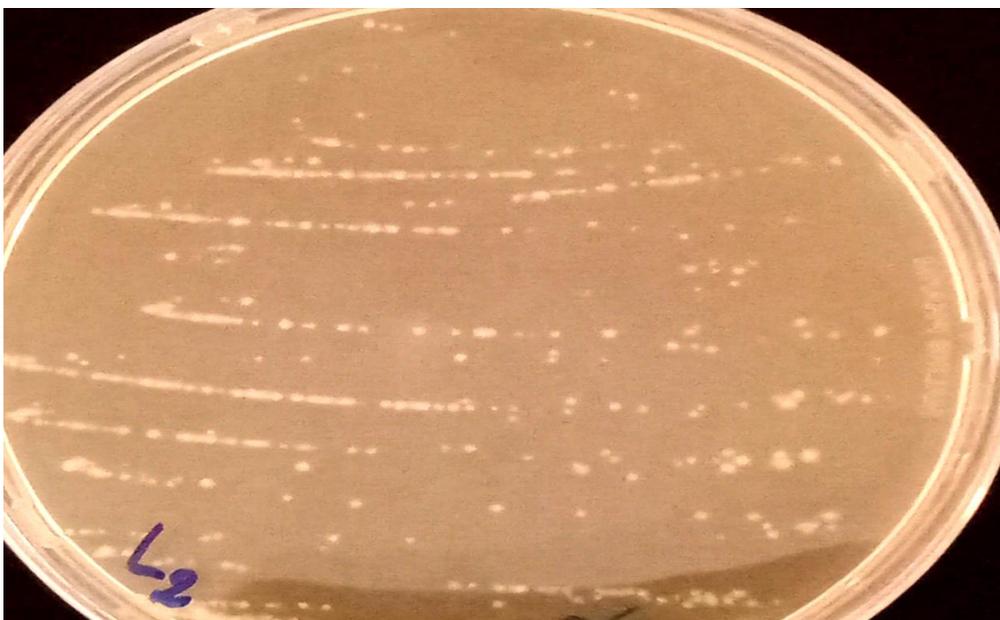


Figure 08 : Aspect macroscopique des colonies de la souche L2

2.2. Aspect microscopique

L'observation au microscope des souches de bactéries lactiques au microscope après coloration de gram permet d'observer deux formes de cellules à Gram +.

1. Des coques disposés en paires (diplocoques) et en chainettes confirmant leur appartenance au genre *Lactococcus sp* (figures 09, 10)

2. Les lactobacilles mésophiles

L'observation microscopique de souches de lactobacilles mésophiles après coloration de Gram révèle la présence de cellules très allongées avec présence de segments confirmant leur appartenance au genre *Lactobacillus sp* (figures 11,12)

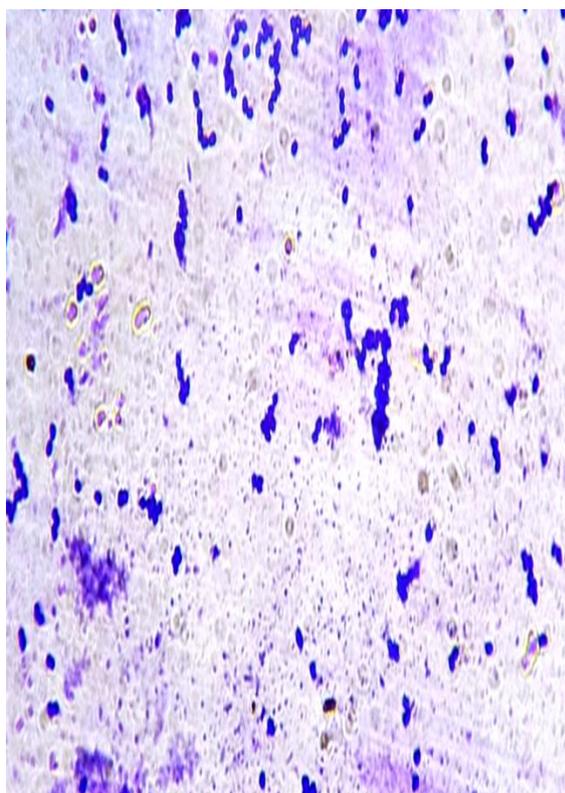


Figure 09: aspect microscopique de la souche BC4

Gr ×1000

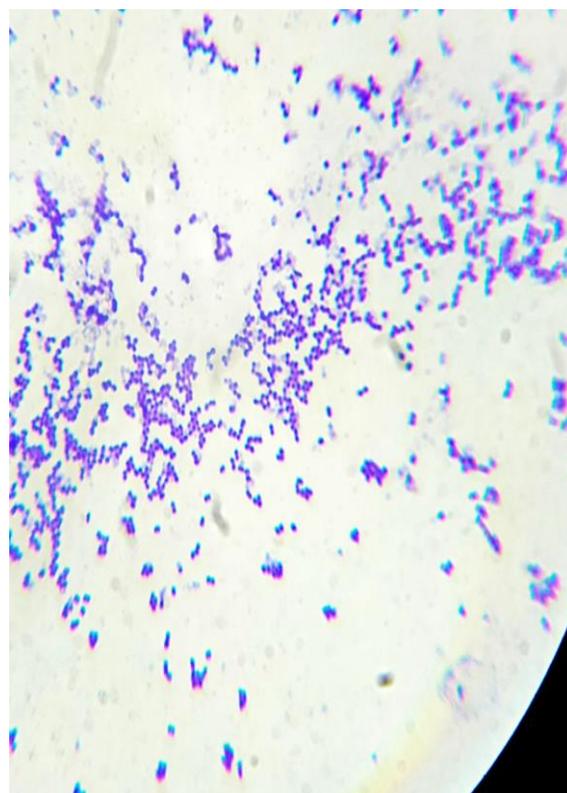


Figure10: aspect microscopique de la souche LC5

Gr ×1000

Résultats et discussion

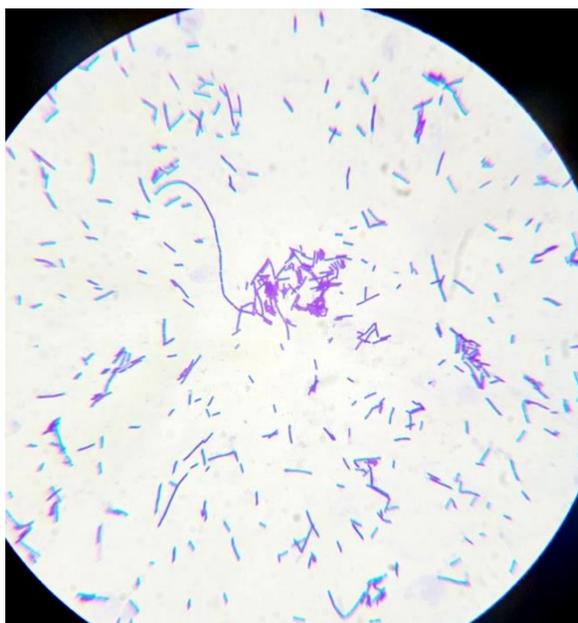


Figure 11: aspect microscopique de la souche L3

(Gr×1000)



Figure12 : aspect microscopique de la souche L2

(Gr×1000)

3. caractéristiques biochimique des souches

Tableau 08: résultats de l'identification phénotypique et biochimique des souches

	Forme	Gram	Catalase	Croissance en présence de 6,5% de NaCl	l'azide de Sodium 0.02%	Croissance à différentes températures	
						37°C	45°C
BC1	Bacille	+	-	-	-	+	-
L2	Baccile	+	-	-	-	+	-
L3	Bacille	+	-	-	-	+	-
BC4	Cocci	+	-	-	-	+	-
BC5	Cocci	+	-	-	-	+	-
LC3	Cocci	+	-	-	-	+	-
LC5	Cocci	+	-	-	-	+	-

4. Les propriétés technologiques et probiotiques des BA

4.1. Activité antibactérienne des souches lactiques

Les souches *E.coli* ATCC 2592, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été utilisées comme des souches indicatrices pour tester l'activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnés dans cette étude.

Les souches indicatrices *E.coli* ATCC 2592, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été cultivées sur le bouillon nutritif (figure 13) et la gélose nutritive (GN). (figure 14)



Figure 13: Culture des bactéries *E.coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923 sur bouillon nutritif



Figure 14: cultures des bactéries *E.coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923 sur gélose nutritif

Résultats et discussion

Toutes les souches de *Lactobacillus* et *Lactococcus* ont montré une activité inhibitrice contre les deux souches indicatrices *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés dans le tableau et les figures (15, 16, 17, 18)

Toutes les souches de *Lactococcus* ont montré une activité inhibitrice forte vis-à-vis *E. coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923.

La souche BC4 montre le diamètre d'inhibition le plus large vis-à-vis *E. coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923 par rapport aux autres souches de la même espèce (figure 17).

Par ailleurs les résultats ont démontré que toutes les souches de *Lactobacillus* produisent des substances antimicrobiennes contre les deux souches pathogènes *E. coli* ATCC 2592 et *S. aureus* ATCC 25923

Les deux souches de *Lactobacillus* L2 et L3 ont donné presque le diamètre d'inhibition vis-à-vis *E. coli* ATCC 2592

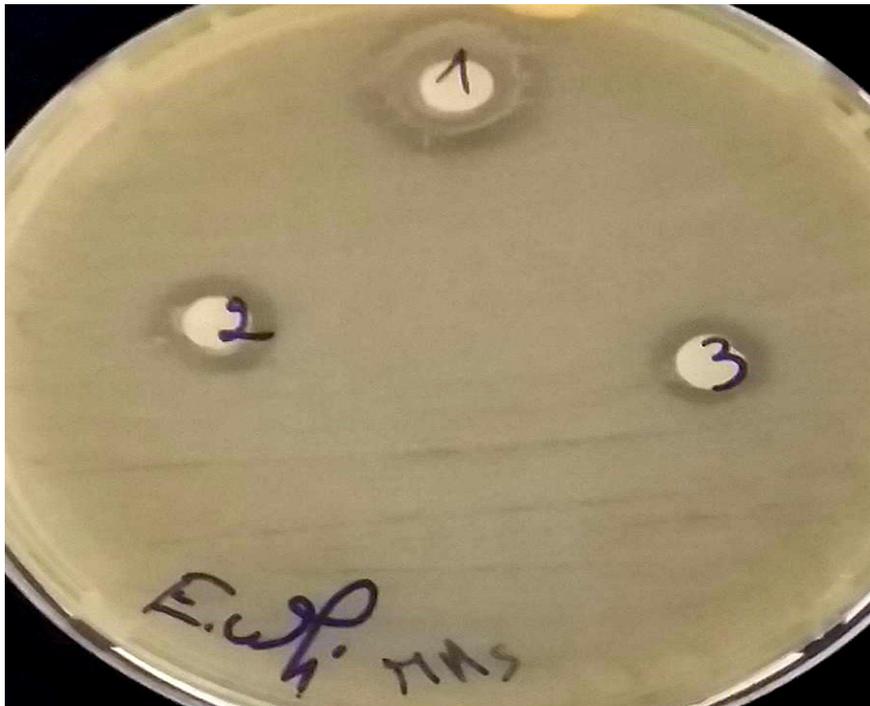


Figure 15: exemple de résultat d'interaction des souches de *Lactobacillus* (BC1, L2, L3) Vis-à-vis *E. coli* ATCC 2592

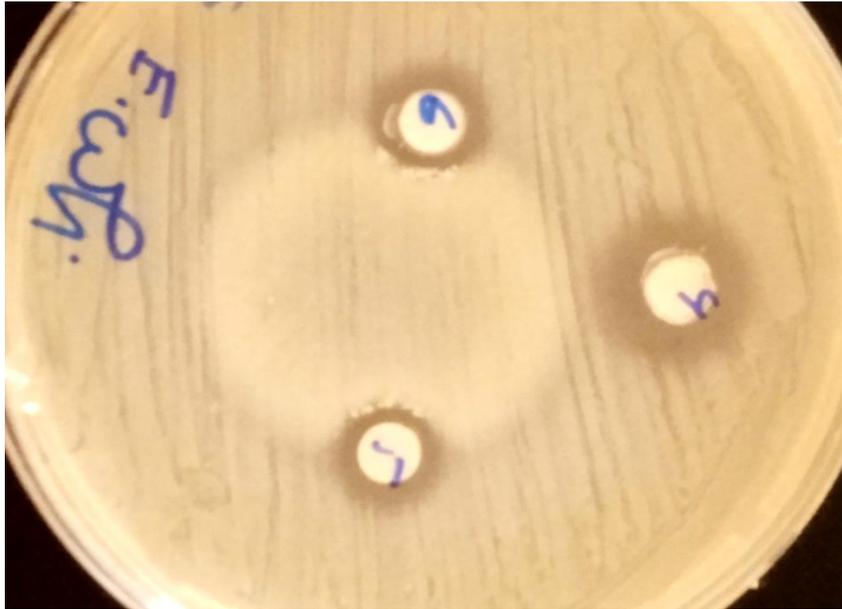


Figure 16: exemple de résultat d'interaction des souches de *Lactococcus* (BC4, BC5, LC3)

. Vis-à-vis *E. coli* ATCC 2592



Figure 17 : résultat d'interaction des souches de *Lactobacillus* (BC1, L2, L3)

. Vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923

Résultats et discussion

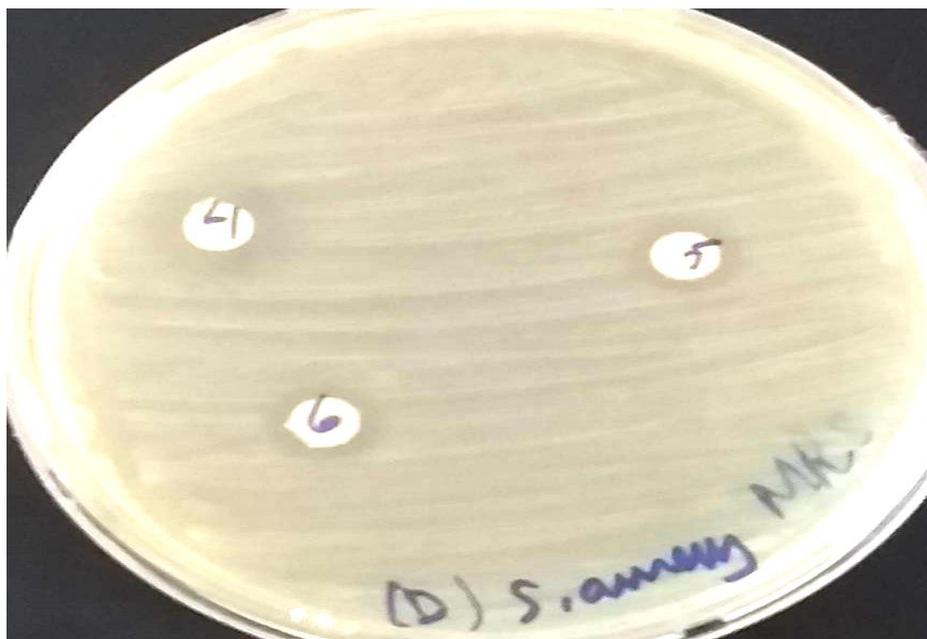


Figure 18: résultat d'interaction des souches de *Lactococcus* (BC4, BC5, LC3) Vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923

Tableau 09 : activité antibactérienne des souches lactiques(LAB) vis à vis *E. coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Souches	Souches indicatrices	
	<i>E.col</i> ATCC 2592	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
BC1	+	+
L2	+	+
L3	+	+
BC4	+	+
BC5	+	+
LC3	+	+
LC5	+	+

+ : réaction positive, - : réaction négative

4.2. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est considérée comme condition préalable à la sélection d'une souche probiotique (FAO/OMS, 2002)

Toutes les souches de *Lactococcus* et *Lactobacillus* ont montré une résistance pour deux type d'antibiotiques testés la pénicilline G (P10IU), et Streptomycin (S10), les résultats sont exprimés dans les figures suivantes :



Figure 19 : test antibiotique de la souche *Lactococcus* LC5

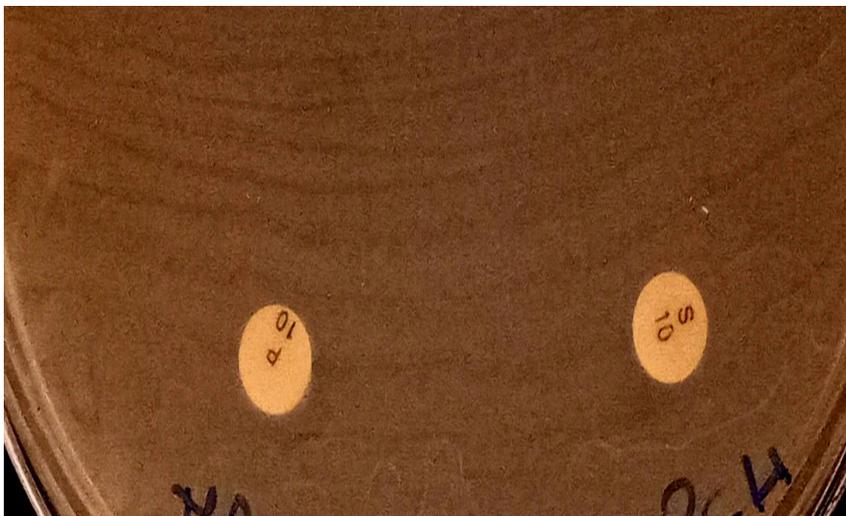


Figure 20 :Test antibiotique de la souche *lactococcus* BC4

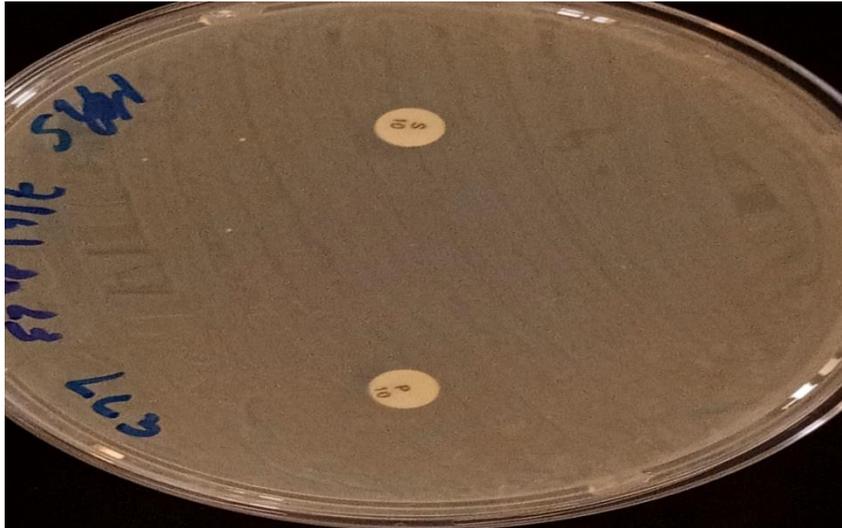


Figure 21 :test antibiotique de la souche *lactococcus* LC3

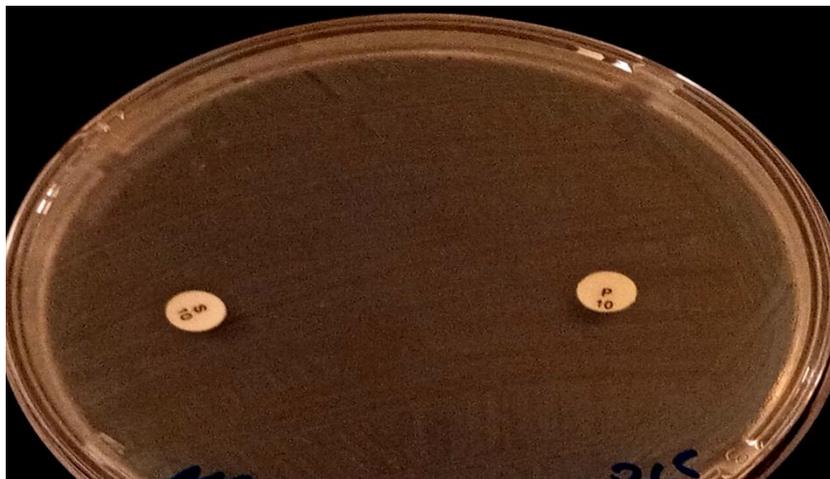


Figure 22: test antibiotique de la souche BC5

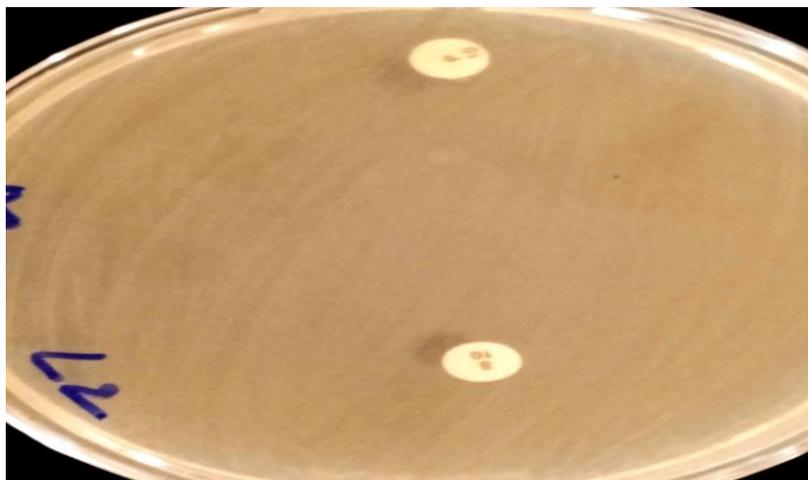


Figure 23 :test antibiotique de la souche *lactobacillus* L2

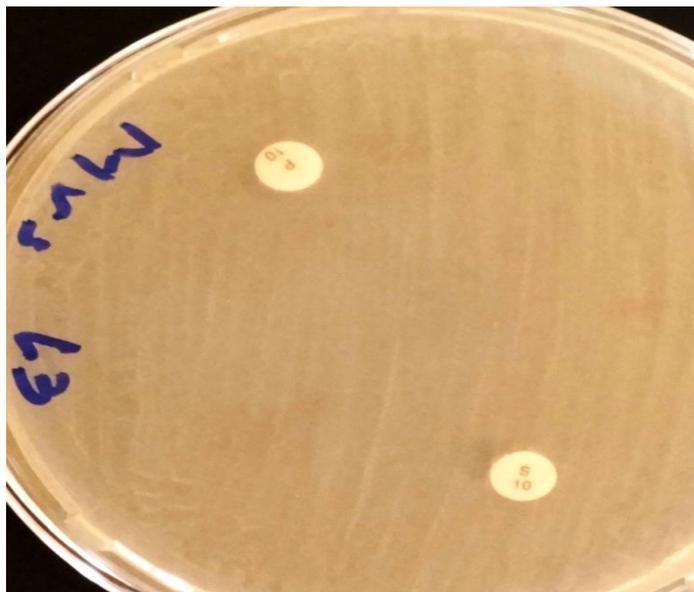


Figure 24 :test antibiotique de la souche lactobacillus L3

4.3. Activité protéolytique des souches

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 a été vérifiée par la présence d'une zone claire entourant les souches de *Lactococcus* et *Lactobacillus*. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10 et les figures 25, 26.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches lactiques de *Lactococcus* et *Latobacillus* isolés ont montré une activité protéolytique.

Nous avons noté que les souches de *Lactococcus* (LC3, BC4, BC5) ont montré les diamètres les plus larges tandis que la souche LC5 a montré un diamètre moins large par rapport aux autres souches de la même espèce.

Par ailleurs, toutes les souches de *Lactobacillus* (BC1, L2, L3) possèdent une activité protéolytique. La souche *Lactobacillus* (BC1) a montré une activité protéolytique faible par rapport aux souches (L1, L2)

Les résultats ont montré que toutes les souches de *Lactococcus sp* et *Lactobacillus sp* ont été capables d'hydrolyser les caséines du lait

La production de bons produits laitiers de qualité fermentée dépend des propriétés protéolytiques des bactéries de départ ;

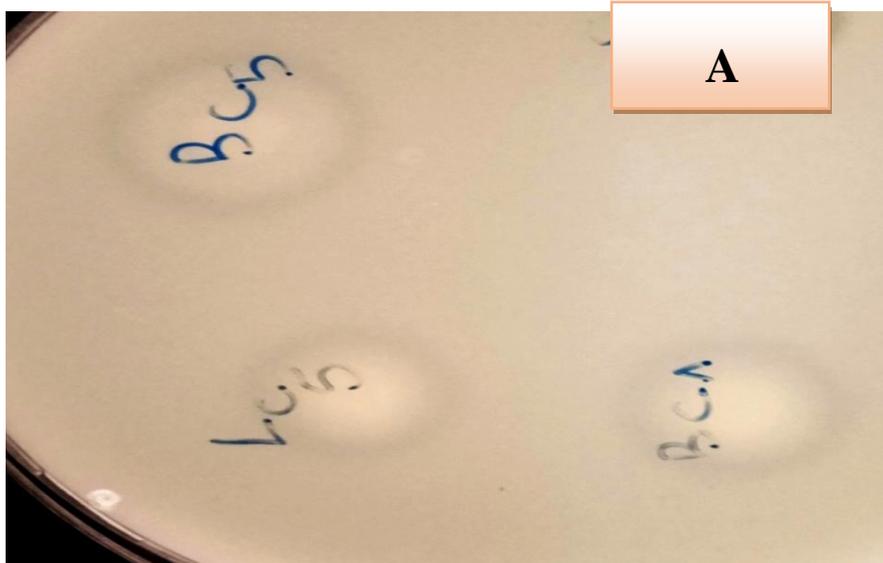


Figure 25: exemple de résultat de l'activité protéolytique des souches de *Lactococcus* (BC5, LC5) et *Lactobacillus* BC1.

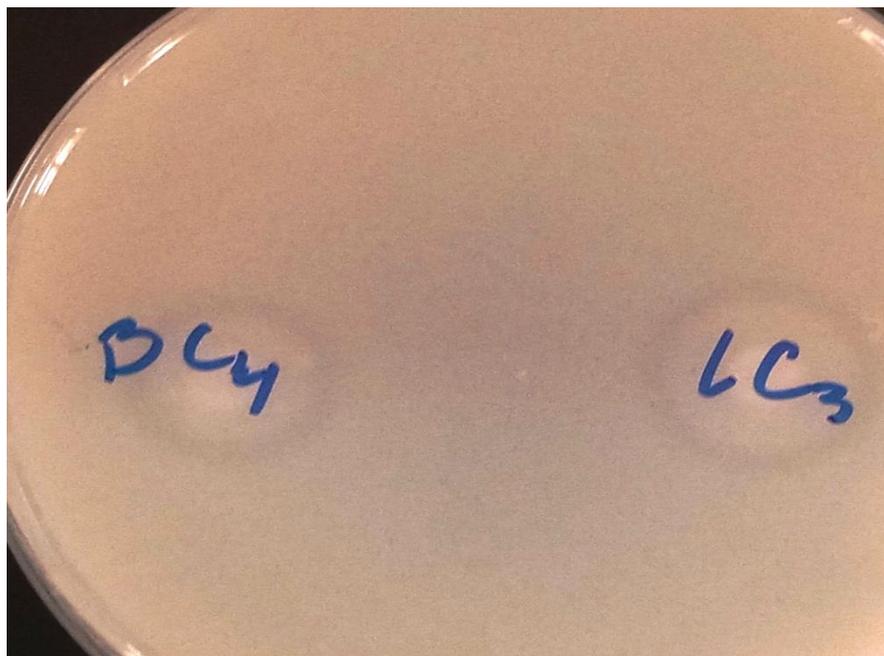


Figure 26: exemple de résultat de l'activité protéolytique des souches de *Lactococcus*

(BC4, LC3)

Tableau 10 : diamètres de la zone de protéolyse des souches testées

Les souches	Protéolyse
BC1	++++
L2,	++
L3	--
BC4	++
BC5	++
LC3	++
LC5	++

4.4. Production de composés aromatiques par les souches lactiques

La production d'acétoïne par l'apparition d'un anneau rouge a la surface du milieu.

Nos résultats révèlent que tous les 5 isolats (BC4, LC3, BC5, LC5, BC1) sont producteurs d'acétoïne (VP+) sur milieu Clark et Lubs.

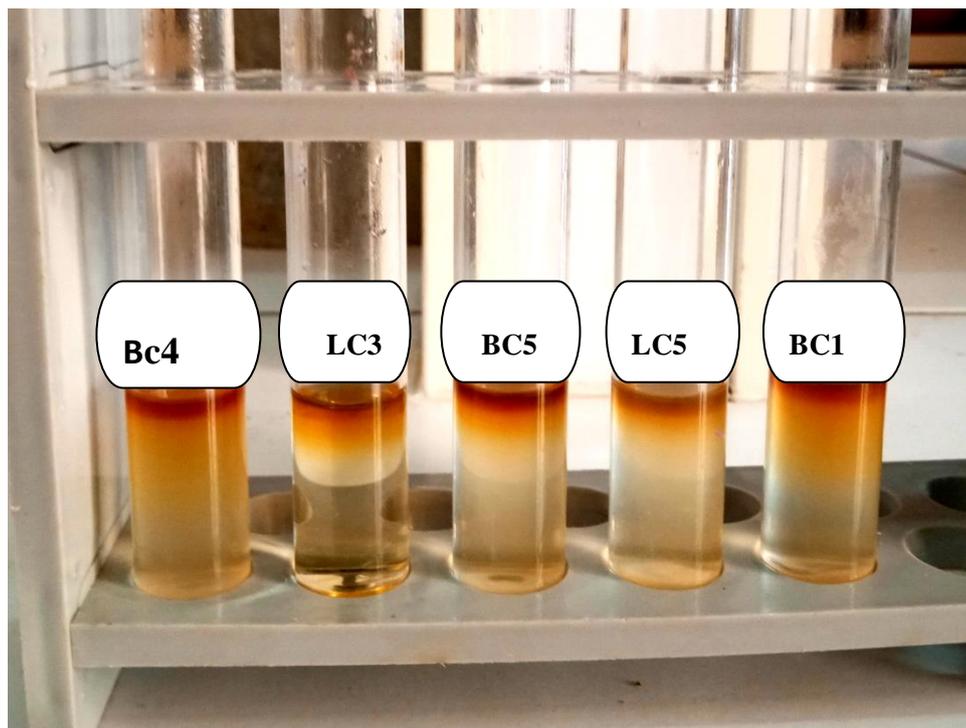


Figure 27 : production d'acétoïne par les souches lactiques

4.5. Production des exopolysaccharides EPS par les souches

4.5.1. Sur milieu hypersaccharosé

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de LAB (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) produisent des exo- polysaccharides (EPS) sur milieu MRS hypersaccharosé, par la formation de colonies croissance larges, gluantes et visqueuses, figures (28, 29, 30)

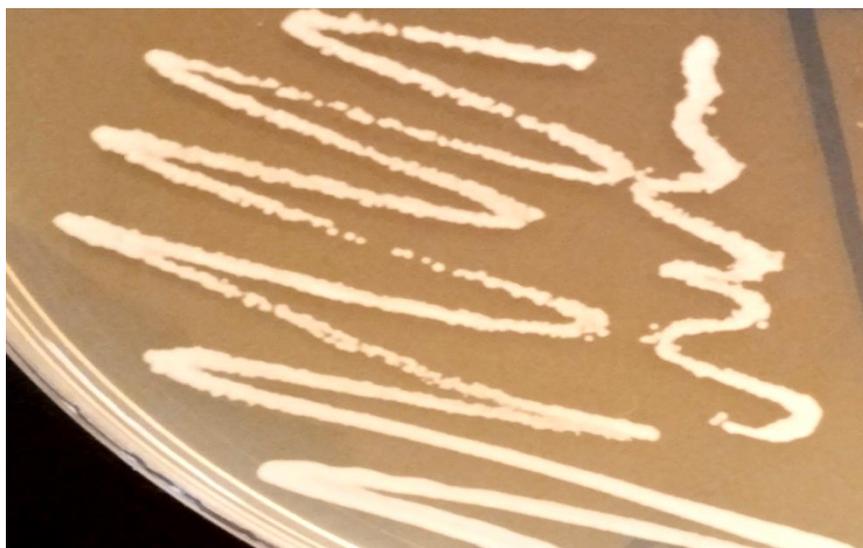


Figure 28 : production des EPS par la souche BC4

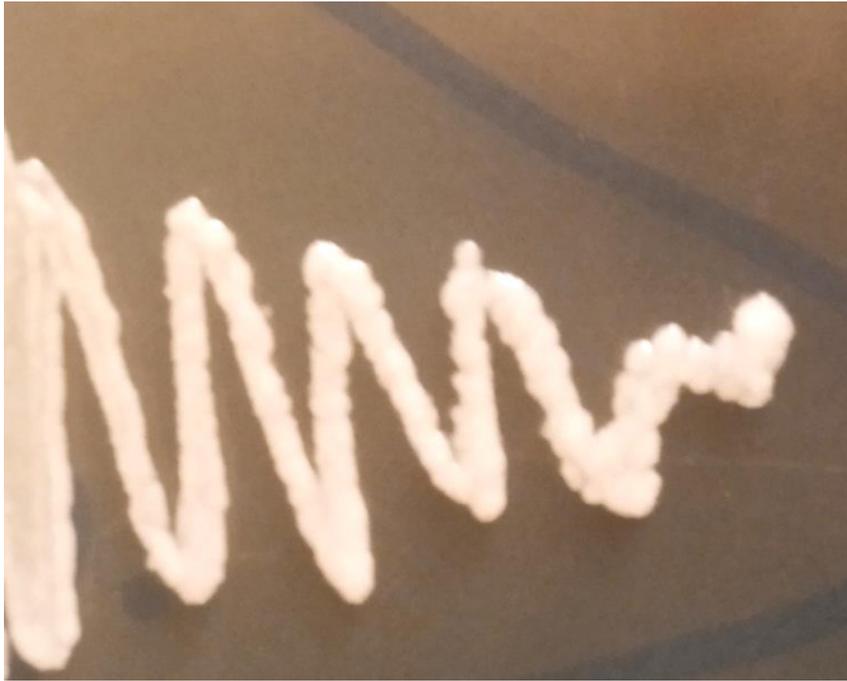


Figure 29: production des EPS par la souche L3

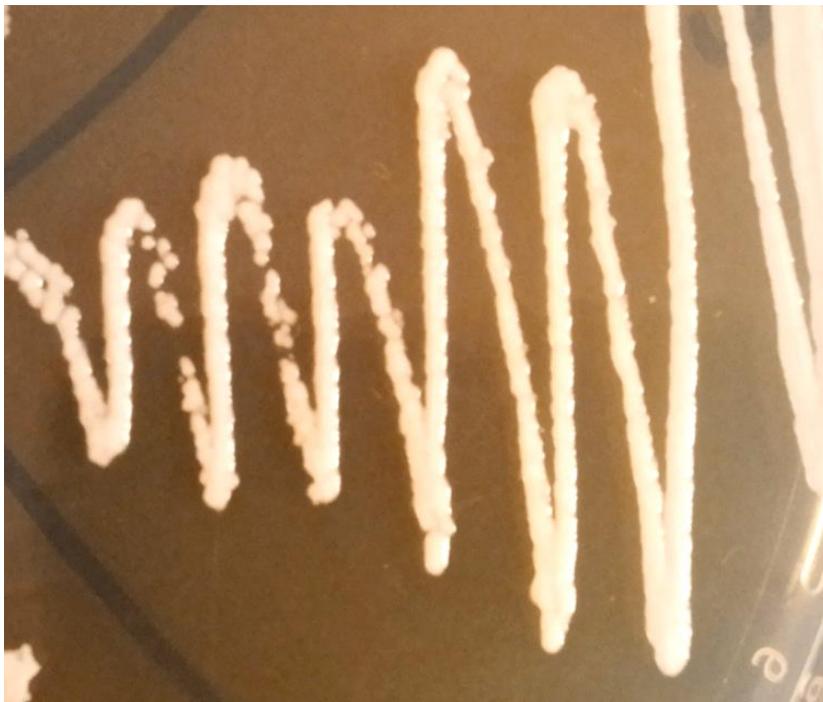


Figure 30: production des EPS par la souche L2

4.5.2. Sur milieu lait à base de ruthénium

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de LAB (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) produisent des exo- polysaccharides (EPS) sur milieu lait à base de rouge de ruthénium, par la formation de colonies de colonies blanches, les résultats sont montrés dans la figure (31)



Figure 31 : production des EPS par la souche LC3

Conclusion

Dans cette étude une recherche des bactéries lactiques a été effectuée dans le but de sélectionner des souches de *Lactobacillus* et *Lactococcus* à potentiel probiotique et technologique. Nous avons traité sept échantillons de lait de chèvre et beurre traditionnel

Notre travail a débuté par l'isolement et la purification de 7 souches appartenant au groupe des bactéries lactiques (LAB) dont 4 ont été affiliées au genre *Lactococcus sp* et 3 au genre *Lactobacillus*. L'identification phénotypique des isolas a été assuré 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* et *Lactococcus* 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* et *Lactococcus* isolés possèdent une activité protéolytique, et ont un pouvoir inhibiteur contre l'agent pathogène *E. coli* ATCC2592, *S. aureus* ATCC2592.

Les résultats totaux obtenus dans cette étude révèlent que les isolats de *Lactobacillus* et *Lactococcus* dans le lait de chèvre et beurre traditionnel ont un potentiel technologique et probiotiques.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

* DESMAZEAUD M, 1996. Alimentation et santé : Les bactéries lactiques dans alimentation humaine. Unité de recherches laitières 78352, Paris, 3-38.

* LABAOUI H, ELMOUALDI L, EL YAHIAOUI M et OUHSSINE M. (2005).Sélection de souches des bactéries lactiques antibacterienne. Bal doc dparm. Bordeaux, 144, 237-250

* LENOIR J, DERNIER Jet WEBER F, 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CIPIL, 9-40.

*Ammor MS, Florez AB, Mayo B .2007.Antibiotic resistance in non enterococcal lactic acid bacteria and bifido bacteria. Food Microbiol Journal 24: 559-570.

*Avril D. et Denis M. 1992. Biopréservation by lactic bactéria. Antonie leeuwenhoek. J.P, 331-345.

*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.

*Declomesnil S, 2014. Pouvoir d'acidification des bactéries lactiques en fonction de leur activité de l'eau et de la durée de stockage. La vague N°40 ; 2.

*Gordana R. Dimié. 2006. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides subs p.mesenteroides* strain from fresh vegetables APTEFF 37, 1-192.

*Guessas B. et Kihal M. 2005. Characterization of lactic acid bacteria isolated from algérian and zone raw goat's .af .J. biotechnnol.3; 6, 339-342.

*Mäyrä-Mäkinen A et Bigret M.2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (SalminenS.,Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed.,Marcel Dekker, Inc. New York,73 102.

*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.

*Zourain A, Accolas J.P et Desmazeand M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristic of yaourt bactéria review .lait . 72: 1-34.

Références Bibliographiques

* Zergoug. A. 2017. Effet des probiotiques et bactéries lactiques vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat. Mostaganem.

*Belyagoubi.L. 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de different ecosystems naturels algériens. Thèse de doctorat en Biologie. Université de Tlemcen .170p

*Leveau J.Y.et,Bouix M.,1993.Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêtindustriel.Tec & Doc,Lavoisier.Paris. 85-87.

*Orla-Jensen S., 1919.The lactic acid bacteria. A.f. hostand son, koenighichen hof boghamdel, copenhagen.

*Walling E.G., Indreau E. Et Lonvau-Funel A., 2001. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de pediococcus damnosus isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection.Inra. 289-300.

*Mahaut M., Jeantet R. Et Brule G, 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tec & doc lavoisier. 194p

*Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V. Et Reinheimer J., 2010.Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In:biotechnology of lactic acid bacteria : novel applications (mozzi f., raya r.r. Et vignolo g.m.). 177-192

*Chamba F.J., 2008. Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec & doc, lavoisier.paris. 787-813

*Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire,(Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240. 282-290

*Caplice E., Fitzgerald G., 1999.Food fermentations: role of microorganisms in food productionand preservation.Int. J. Food Microbiol, 50(1-2) : 131-149

*Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N.(2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature

Références Bibliographiques

*DeVosP., GarrityG.M.,JonesD., KriegN.R., Ludwig W., RaineyF.A., SchleiferK.H.and

*Djermane.I. 2019. Dénombrement, isolement et identification isolées à partir de bactéries lactiques à activité antibactérienne isolées à partir de lait et de fromage traditionnel Bouhezza de chèvre. Mémoire de master ; université Oum EL-BOUAGHI.

*Guiraud,J.P.,1998.Microbiologie alimentaire.Agroalimentaire DUNOD,paris.652pp:

Survey.Critical Rev. Microbiol, 28 : (4) 281-370.

WhitemanW.B.,2009.Bergey"sManual of Systematic Bacteriology:The firmicutes. Second Edition. Volume ThreeSpringer.

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

▪ Milieu MRS (De Man Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g.
Extrait de viande.....	10 g.
Peptone	10 g.
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g.
Citrate d'ammonium.....	2g
Glucose	20 g.
KH ₂ PO ₄	2 g.
Mg SO ₄	0,25 g.
MnSO ₄	0,05 g.
Tween80.....	1 ml.
Agar –Agar	15 g.
Eau distillée	1000 ml.
PH =	6,5.
Autoclave 120 C°/20 minutes.	

▪ Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Extrait de levure.....	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2.5 g
Tryptone	2,5 g
Peptone papainique de soja.....	5 g
Extrait de viande.....	.5,0 g

Acide ascorbique.....	0,5 g
Lactose.....	5 g
β -Glycérophosphate de sodium.....	19 g
MgSO ₄	0,25 g
Agar –agar.....	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH =.....	6, 2
Autoclave 120 C°/20 minutes.	

▪ **Milieu lait a base de rouge de rethénium**

Lait en poudre	10 g
L'eau distillé.....	100 ml
Extrait de levure.....	0,1 g
Rouge de ruthénium.....	0,08 g/l

▪ **MRS hypèrsacharosé**

Extrait de levure	5 g.
Extrait de viande.....	10 g.
Peptone	10 g.
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g.
Citrate d'ammonium.....	2g
Glucose	20 g.
KH ₂ PO ₄	2 g.

Mg SO4	0,25 g.
MnSO4	0,05 g.
Tween 80.....	1 ml.
Agar –Agar	15 g.
Eau distillée	1000 ml.
Sacharose.....	100g
PH	6,5.

Autoclave 120 C°/20 minutes.

▪ **Milieu YMA**

Extrait de levure	3g
Peptone	5g
L'ait en poudre	10g
Eau distillée	1000ml
Agar –Agar	15g
PH.....	6,5

Autoclave 120 C°/20 minutes.

▪ **Bouillon nutritife (BN)**

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée	1000ml

PH.....6,5

Autoclave 120 C°/20 minutes.

▪ **Gélose nutritive (GN)**

Extrait de levure2 g.

Extrait de viande.....1g.

Peptone5 g.

Chlorure de sodium.....5g

Agar –Agar15g

PH.....6,5

Autoclave 120 C°/20 minutes.

▪ **Milieu Clark et Lubs**

Pour 1litre de milieu:

Peptone.....5g -

Glucose.....5g

Phosphate bipotassique.....5g

L'eau distillée.....1000ml

• **Préparation du lait écrimer**

Lait en poudre 20 g

L'eau méniral.....200 ml

Extrait de levure.....0,6 g

- Ajouter 20 g de lait en poudre dans l'eau avec une agitation jusqu'à une température de 95 C° , après en laisse le lait refroidi .

- **L'eau physiologique**

chlorure de sodium.....9g.

L'eau distillée..... 1000ml

Annexe 02: Coloration de GRAM

- **Mode opératoire**

A partir des boîtes de pétri: Vous Observer l'aspect, la couleur et la forme des colonies.

- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.

- Toucher une colonie à l'aide d'une pipette de pasteur stérile pour prélever des bactéries.

- Frotter la pointe dans la goutte d'eau.

- Laisser sécher à l'air.

- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

- **Coloration :**

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé.

Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.

- Jeter l'excès de colorant dans un bécher.

- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis) Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis. Le Lugol est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.

- Laisser agir 1 minute.

- Jeter la solution de Lugol dans un bécher

- Après quelque seconde ajouter l'alcool après une minute , Rincer à l'H₂O.

- Ajouter le fushine , pendant une minute rincer a l'eau et laisser sécher à l'air.

- Observer au microscope (avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 100x) .