



République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie

# Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par

**LAKEHAL CHAIMA**

&

**BLIL CHAHINEZ**

Thème :

**Etude des propriétés fonctionnelles de la flore lactique impliquée en technologie laitière**

Soutenu le 26/06/2023.

Devant le jury composé de :

Président	DJBAOUI R	Professeur	Université de Mostaganem
Encadreur	LABTAR A	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	CHERIGUENE A	Professeur	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

## *Remerciements*

*Avant tout, Nous tenons à remercier le Dieu tout puissant qui nous a  
Donner le courage, la volonté, la santé, l'amour du savoir et surtout  
la patience pour mener ce travail jusqu'à son bout.*

*Nous ne saurions trouver les termes qu'il faut pour exprimer notre  
profonde gratitude à notre promotrice adorée : Mme Labtar Asma pour  
sa gentillesse et sa sympathie, ses précieux conseils et pour le précieux  
temps qu'elle nous consacré tout au long de cette période mais surtout sa  
disponibilités permanente a toujours suscite notre admiration.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury Mr  
Djibaoui Rachid d'avoir de présider nous travail. Ainsi que Mr.  
Cherigane Abderrahim pour avoir acceptés d'examiner ce mémoire.*

*Mes remerciements vont à les ingénieurs du laboratoire de la faculté SNV  
en particulier qui nous a aidé à réaliser ce travail dans de bonnes  
conditions. Et plus particulièrement à Mr Abaidi, Mme Abbou saadia et  
leurs collègues pour leur accueil sympathique et leur coopération  
professionnelle.*

*Mes remerciements vont à Tous les enseignants de la Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie de l'Université Abd El Hamid Ibn Badis  
Mostaganem veuillez trouver ici l'expression de mes sincères  
remerciements pour la qualité de votre enseignement.*

*Enfin, je remercier mes parents pour leur soutien inconditionnel. Et pour  
tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour nous permettre de suivre nos  
études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessez de  
nous encourager tout au long de nos années d'études.*

*Enfin, À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de  
ce travail.*



## Dédicace

*Je dédie ce travail à :*

*La plus cher à mon cœur sur cette terre, Ma chère mère qui m'a appris à être femme et qui m'a beaucoup aidé dans mes études, pour les sacrifices qu'elle a faits, pour mon éducation et la confiance et L'amour qu'elle m'a toujours accordé. Grâce à toi j'ai pu surmonter toutes les difficultés.*

*Mon cher père qui a été toujours un exemple pour moi, et qui a veillé à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance . Puisse dieu vous accorder sante et longévité*

*A ma très chère grand-mère que je demande à Dieu de prolonger sa vie , Et mon grand-père Mohamed qui nous a laissée tôt, que dieu le plus puissant l'ait en sa sainte miséricorde.*

*A mes sœurs Amina et Wissal pour tout l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leur précieux encouragement*

*A ma tante : Fadila qui je considère comme ma grande sœur*

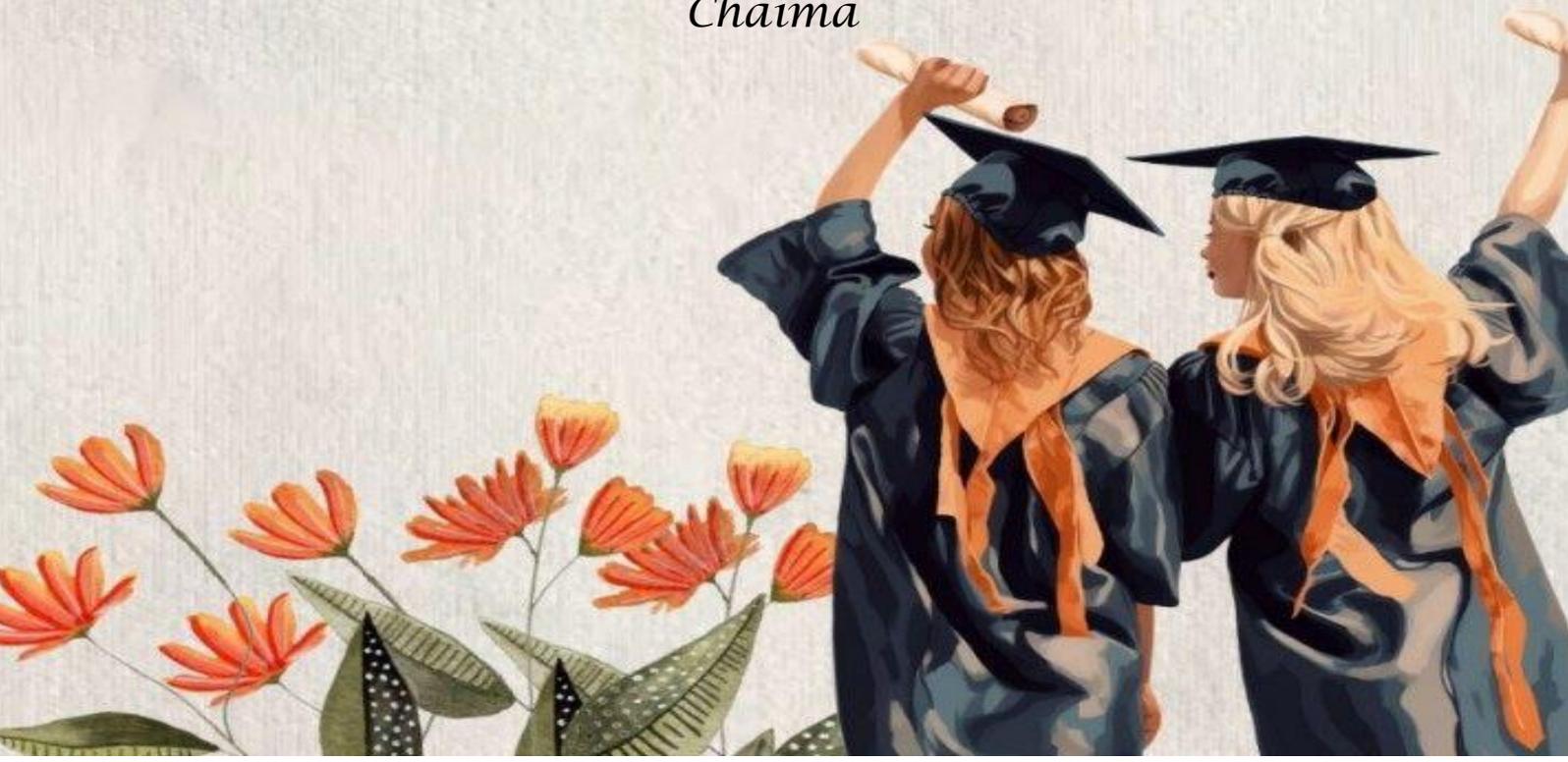
*A ma ami Chahinez qui la volonté d'Allah a fait qu'elle ne soit pas parmi nous, que Dieu ait pitié d'un cœur débordant de pureté .*

*A celle qui partage mes joies et mes peines; ma meilleure amie Nafissa.*

*A toutes mes amies Hafsa, Yamina , Fatima, Nardjes , Hadjer, Hadile, Salima qui me rendirent ma vie agréable et pleine de bons souvenirs.*

*A tous la promo de microbiologie appliquée 2022/2023.*

## Chaïma



## Résumé

Les bactéries lactiques présentent une partie de notre alimentation quotidienne, elles sont des micro-organismes présents dans le lait et ces dérivés.

Dans cette étude, 10 souches de *Lactobacillus* ont été isolées à partir de deux origines du lait de vache et de brebis. Après l'isolement les souches ont été caractérisées et identifiées par des tests classiques tests que les morphologiques, physiologiques et biochimiques pour identifier le genre puis testés leurs aptitudes technologiques : pouvoir aromatisant 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 25923

Les résultats obtenus indiquent que certains souches présentent des aptitudes technologiques intéressantes: la production des exopolysaccharides (EPS), pouvoir aromatisant, pouvoir protéolytique important avec un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes utilisés.

**Mots clés :** activité protéolytique, bactéries lactiques, *Lactobacillus* , EPS, activité antibactérienne .

## Abstract

Lactic acid bacteria are part of our daily diet , they are microorganisms present in milk and these derivatives.

In this study, 10 strains of *Lactobacillus* were isolated from two origins of cow's and sheep's milk. After isolation, the strains were characterized and identified by standard tests such as 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: antibacterial power against pathogenic bacteria: *E.coli* ATCC 2592, *S.aureu* ATCC 25923

The results obtained indicate that certain strains have interesting technological aptitudes: the production of exopolysaccharides (EPS), flavoring power, and significant proteolytic power with an inhibiting power against the pathogenic germs used.

**Key words:** proteolytic activity, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, EPS, antibacterial activity.

## ملخص

تعد بكتيريا حمض اللاكتيك جزءاً من نظامنا الغذائي اليومي ، فهي كائنات دقيقة موجودة في الحليب ومشتقاته.

في هذه الدراسة ، تم عزل 10 سلالات من *Lactobacillus* من أصلين من حليب البقر والأغنام. بعد العزل ، تم توصيف السلالات وتحديدتها من خلال الاختبارات المعيارية مثل الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية والكيميائية الحيوية لتحديد الجنس ثم اختبار كفاءتها التكنولوجية: النشاط العطري والمحلل للبروتين ، والقدرة على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية (EPS) ، وخصائصها الحيوية. : قوة مضادة للجراثيم ضد البكتيريا المسببة للأمراض *E.coli* ATCC 2592 ، *S.aureu* ATCC 25923 .

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن سلالات معينة لديها قدرات تكنولوجية مثيرة للاهتمام: إنتاج عديدات السكاريد الخارجية (EPS) ، قوة النكهة ، قوة تحلل البروتين مع قوة تثبيط ضد الجراثيم المسببة للأمراض المستخدمة.

**الكلمات المفتاحية:** النشاط التحلل للبروتين ، بكتيريا حمض اللاكتيك ، *Lactobacillus* ، EPS ، النشاط المضاد للبكتيريا.

# SOMMAIRE

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Résumés (arabe, anglais et français)</b>	1
<b>Introduction</b>	
<b>Revue Bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les Bactéries lactique</b>	
1. Historique des bactéries lactique	3
2. Définition des bactéries lactique	3
3. Ecologie des principaux genres des bactéries lactique	
4. Classification phylogénétique des bactéries lactique.	
4.1. Classification phénotypique et biochimique	
4.2. Classification génotypique	
4.2.1. Le genre Lactobacillus	
5. Propriétés technologiques des bactéries lactiques	
5.1. L'activité acidifiante	
5.2. L'activité protéolytique	
5.3. L'activité aromatisante	
5.4. L'activité lipolytique	
5.5. L'activité antibactérienne	
5.5.1. Les acides organique	
5.5.2. Le peroxyde d'hydrogène	

5.5.3. Le dioxyde de carbone	
5.5.4. Le diacétyle	
5.5.5 Le production d'antibiotique (reutérine)	
5.5.6. Les bactériocines	
5.6. La synthèse des exo-polysaccharides (EPS)	
6. Application industrielles des bactéries lactique	
6.1. Domaine alimentaire et thérapeutique	
6.2. Domaine médical	
6.2.1 Les bactéries lactique comme probiotiques	
6.3. Biopréservation	
7. Identification moléculaire des bactéries lactique	
7.1. Détermination du pourcentage Guanine+Cytosine (% G+ C)	
7.2. Séquençage de L'ADN ribosomal 16S	
7.3. La technique PFGE (Electrophorèse sur gel en champ pulsé)	
7.5. Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) de l'ADNr16	
7.5.1. Les principales étapes de la PCR	
Chapitre II : Généralités sur le lait.	
1. Définition du lait	
2. Les phases de lait	
3. Composition chimique du lait	
3.1. Eau	
3.2. Matière grasse	
3.3. Vitamines	
3.4. Enzymes	
3.5. Glucides	

3.6. Sels organiques et minéraux	
3.7. Protéines	
3.8. Les caséines	
3.9. Les protéines du lactosérum	
4. Définition Lait de vache	
4.1. Composition du lait de vache	
5. Définition Lait de brebis	
5.1. Composition du lait de brebis	
Chapitre III : Matériel et Méthodes.	
1. Objectif de travail	
2. Lieu de travail	
3. provenance des échantillons	
4. Les souches de références utilisées	
5. Milieux de culture des souches	
6. Isolement et purification des souches lactiques	
7. Purification des souches	
8. Conservation des souches bactériennes	
9. Caractéristiques phénotypiques des souches de lactobacilles	
9.1. Etude morphologique	
9.1.1. Examen macroscopique	
9.1.2. Examen microscopique	
9.1.3. Les étapes de coloration de Gram	
10. Critères physiologique et biochimique	
10.1. Test de la catalase	
10.2. Croissance a différentes températures	

10.3. Croissance de différentes concentrations NaCl	
10.4. Croissance en milieu hyperalcalin pH 9.6	
11. Caractérisation technologique des souches	
11.1. Activité antibactérienne des souches de lactobacilles	
11.2. Activité protéolytique des souches de lactobacilles	
11.3. Pouvoir aromatiques	
11.4. Production des exopolysaccharides (EPS)	
Chapitre IV : Résultats et discussion	
1. Isolement et purification des souches lactique	
2. Identification phénotypiques des souches de lactobacilles	
2.1. Examen macroscopique	
2.2. Etude microscopique	
3. Observation macroscopique et microscopique des souches indicatrices utilisées dans cette étude	
4. Description microscopique des souches indicatrice	
5. Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats de lactobacilles	
5.1. Activité antibactérienne	
5.2. Activité protéolytique	
5.3. Pouvoir aromatisant	
5.4. Production des exopolysaccharides (EPS)	
5.4.1. Sur milieu hypersaccharosé	
5.4.2. Sur milieu lait à base de rethénium	
Conclusion générale	
Références bibliographiques	

## Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique.
BN	Bouillon nutritif.
°C	Degré Celsius.
EPS:	Exopolysaccharides.
FAO	Food and Agriculture Organisation des Nations unies.
h	Heure.
GN	Gélose nutritive.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde.
g	Gramme.
LAB	Bactéries lactiques.
Lb	Lactobacillus.
Lc	Lactococcus.
Ln	Leuconostoc.
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe.
MG	Matière Grasse.
ml	Millilitre.
min	Minute.
NaCl	Chlorure de sodium.
pH	Potentiel d'hydrogène.
S. aureus	Staphylococcus aureus.
s	Secondes.
Trs	Tours.
T°	Température.
VP	Voges-Proskauer.
V	volume.
µl	microlitre.
%	Pour cent.

## Liste des Tableaux

Tableau 01 : Milieux d'isolement de bactéries lactiques	
Tableau 02 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	
Tableau 03 : Groupes des genres <i>Lactobacillus</i>	
Tableau 04 : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et Exemples des espèces prédominantes	
Tableau 05 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humain	
Tableau 06 : Techniques utilisées pour l'identification génotypiques des bactéries lactiques	
Tableau 07 : La composition chimique du lait	
Tableau 08 : Composition moyenne du lait de différentes espèces	
Tableau 09 : Composition lipidique du lait	
Tableau 10 : Composition vitaminique moyenne du lait	
Tableau 11 : Caractéristiques des principaux enzymes du lait	
Tableau 12 : Composition minérale du lait de vache	
Tableau 13 : Classification des protéines du lait	
Tableau 14 : Composition générale du lait de vache	
Tableau 15 : Comparaison moyenne du lait de vache	
Tableau 16 : Teneur en vitamines de lait de vache mg/litre	
Tableau 17 : Teneur moyenne en g/L et distribution des protéines dans le lait de vache	
Tableau 18 : Composition en lipides de lait de vache	
Tableau 19 : Teneur en élément de lait de vache	
Tableau 20 : Teneur moyenne en g/L et distribution des protéines dans le lait de brebis	
Tableau 21 : Teneur en vitamines de lait de Brebis mg/litre	

Tableau 22 : Teneur en élément de lait de vache	
Tableau 23 : Provenance et l'origine des échantillons.	
Tableau 24 : Référence et origine de différentes souches pathogènes utilisées	
Tableau 25 : Les codes des souches lactique isolées.	
Tableau 26 : Résultats de l'identification phénotypique et biochimique des isolats de lactobacilles	
Tableau 27 : Observation microscopique des deux souches <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 après coloration de Gram.	
Tableau 28 : Activité antibactérienne des souches des bactéries lactique vis à vis <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Tableau 29 : Valeurs moyennes du diamètre de la zone de protéolyse Souches lactiques.	
Tableau 30 : Production d'exo polysaccharides par les bactéries lactique.	

## Liste des Figures

Figure 01 : L'Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16s	
Figure 02 : <i>Lactobacillus sp</i>	
Figure 03 : Représentation schématique des possibles effets bénéfiques des EPS au niveau	
de l'organisme humain d'après	
Figure 04 : Utilisation industrielles des bactéries lactique	
Figure 05 : Les étapes de déroulement de la PCR	
Figure 06 : Composition de la matière grasse du lait	
Figure 07 : Représentation schématique de la micelle du lait	
Figure 08 : Echantillons de lait.	
Figure 09 : Schéma illustratif des étapes de l'isolement.	
Figure 10 : Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées a refaire il faut ajouter à 4°C	
Figure 11 : Les différentes étapes de coloration de Gram	
Figure 12 : Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles de la souche LV1 et la souche LB2.	
Figure 13 : Aspect des souches pures sur bouillon MRS.	
Figure 14 : Aspect microscopique des souches <i>lactobacillus</i> (G × 100).	
Figure 15: Culture des bactéries pathogène <i>E. coli</i> 2592 et <i>S. aureus</i> 25923 sur gélose GN.	
Figure 16 : Observation microscopique de <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram (G × 100)	
Figure 17: Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> après coloration de Gram (G × 100)	
Figure 18 : Culture des bactéries pathogène <i>E. coli</i> et <i>S.aureus</i> dans le bouillon GN	
Figure 19 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	

Figure 20 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
Figure 21 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592.	
Figure 22 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592.	
Figure 23 : L'activité protéolytique des souches de lactobacillus.	
Figure 24 : Production d'arome par les bactéries lactiques.	
Figure 25 : production des EPS par L4 (milieu hypèrsaccharosé 10%)	
Figure 26 : Aspect macroscopique des colonies des souches isolées sur milieu lait et Rouge de ruthénium.	

# **INTRODUCTION**

Des sa naissance, le jeune mammifère se nourrit de lait .Il est en fait un des aliments le plus complet, contenant ses éléments nécessaires a la croissance (Chettah , 2019).

Le lait est une source importante de protéines, riche en lipides, en acides amines essentiels, en vitamine A et de faible quantités de vitamine D, E, sans oublier les minéraux tel que le calcium, magnésium, et le fer.

La recherche sur les bactéries lactiques et leur caractérisation a énormément modifié la fabrication des produits laitiers fermentés ; la capacité de manipuler et de contrôler ces microorganismes a atteint un tel niveau qu'il était inimaginable d'y penser il y a quelques années (Eijenk, 2002).

Ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleurs souches et d'améliorer la productivité, la qualité et la sûreté des produits finaux.

La caractérisation des bactéries lactiques en favorise le développement des souches bactériennes bien définies ,maintenant connues sous le nom de levains lactiques qui jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitières (Rabah , 2010).

Les bactéries lactiques désignent les bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbone .Elles ont un rôle important dans plusieurs processus de traitements de matières premières, dans la fabrication de produits finis .Elles contribuent a la texture, a la saveur des aliments ainsi qu'a la production des composés aromatiques.

La diminution du pH par l'effet acidifiant de ces bactéries est favorable a la bio conservation des denrées alimentaires. Les bactéries les plus utilisées ; les lactobacilles, les bifidobacterium et les Streptococcus ( Carine *et al.*,2009 ).

Etant des probiotiques , elles apportent un bénéfice a l'hôte lui conférant une balance de la microflore intestinale et en pourait un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem *et al.***, 2008) .

Différentes études ont démontrées le rôle préventif, et curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées ( **Mkrтчhyan *et al.***, 2010 ).D autre ont cite leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce a leur activités protéolytiques(**Pougheon *et Goursaud***, 2001).

Les bactéries lactiques produisent des bactériocines qui sont de véritables conservateurs contre certains microorganismes indésirables (**Salminen *et al.***, 2004)

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques fonctionnelles permettent de réduire le nombre des microorganismes dans les produits laitiers (Abee *et al.*, 1995).

L'effet inhibiteur des bactéries lactiques est à l'origine de la production d'acide organique, Les lactobacilles ont un pouvoir résistant à un pH acide.

Le but de cette étude est d'une part d'isoler des souches de *Lactobacillus* a partir de lait de vache et brebis, d'autre part a la recherche des propriétés fonctionnelles tels que : l'activité protéolytique, pouvoir aromatisant, l'activité antibactérienne par la recherche des agents inhibitrices vis-à vis de pathogène.

# **Chapitre I :**

## **Partie**

# **Bibliographique**

## 1. Historique des bactéries lactiques

La première apparition était par **Orla Jensen (1919)** au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). Elles ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (**Dridier et Prevost., 2009**).

En **1857**, Pasteur a réalisé le procédé de fermentation pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries, La première culture bactérienne pure de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 (**Mechai, 2009**).

## 2. Définition

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, qui peuvent avoir des formes bacillaires, coccoïdes, ou coccobacillaires (**Hammi, 2016**). Elles sont un group de bactérie à Gram positif, immobiles, sporulées, anaérobies, dépourvues de catalase. C'est une famille de microbes capables de fermenter de nombreux nutriments, principalement en acide lactique (**Atlan et al., 2008 ; Caplice et Fitzgerald., 1999**).

Elles constituent un ensemble de micro-organismes capables de transformer des sucres simples comme le lactose ou le glucose en acide lactique. Cette transformation génère de 1 ou 2 molécules d'AP, en fonction de la voie métabolique homo ou hétérolactique (**Raimbault, 1995**)

Ces molécules peuvent être mobilisées pour la production de l'énergie nécessaire aux biosynthèses et à la multiplication cellulaire

Selon le métabolisme glucidique, Les bactéries lactiques divisées en deux groupes :

- **Homo fermentaires** : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- **Hétéro fermentaires** : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO<sub>2</sub> et autres acides organiques (**Priyanka et Prakash, 2009**).

### 3. Ecologie des principaux genres des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes retrouvés dans différentes niches écologiques (Mechai, 2009). Les LAB sont généralement associées à des matières premières animales et aux produits alimentaires fermentés correspondants, y compris les produits laitiers, viande, légumes et céréales, où la fermentation peut avoir lieu (Bouguerra, 2021).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud, 1996).

**Tableau 01 : Milieux d'isolement de bactéries lactiques (Hassaine, 2013).**

Genre, espèce (sp.) sous-espèce (ssp.), variante (var.)	Type de produit
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>var. diacetylactis</i> <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	Fromages blancs, à pâte molle, à pâte pressée non cuite ou persillée, beurre, crème
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yaourts, fromages (surtout ceux à pâte pressée cuite)
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Yaourts
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Fromages à pâte pressée cuite, laits fermentés
<i>Lactobacillus casei</i>	Laits fermentés, pain
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pain, gari, choucroute, olives

<i>Lactobacillus brevis</i>	Cidre,pain,olives
<i>Lactobacillus sp.</i>	Saucissons
<i>Leuconostoc oenos</i>	Vins,cidre
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.cremoris</i>	Beurre,creme,fromages
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	Choucroute,cidre,pain,olives
<i>Pediococcus sp.</i>	Cidre
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	Pain,saucissons secs
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ensilage,fromages,porc et riz fermentes
<i>Pediococcus rhamnosus</i>	Choucroute

#### 4. Classification phylogénétique des bactéries lactiques

##### 4.1. Classification phénotypique et biochimique

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla- Jensen**. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques (cocci ou bâtonnets, formation de tétrades), biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimio taxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la

membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Belyagoubi, 2014), , ainsi d'acide lactique produit et fermentation de différents glucides(homo- ou hétéro-fermentation) et la capacité de se développer aux concentrations élevées en sel (6.5%, 18%), la tolérance des conditions acide ou alcaline (Boumediene, 2013 ).

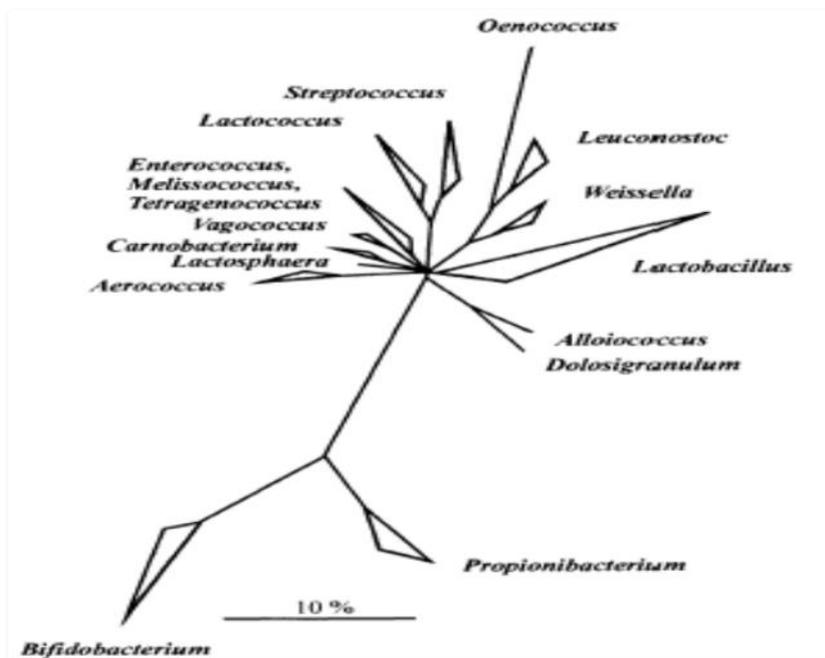
## 4.2. Classification génotypique

La taxonomie des bactéries lactique (BL) a été révolutionnée en introduisant la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques qui a conduit à une reclassification importante de certaines espèces et sous-espèces comme hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage des gènes d'ADNr 16s ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les espèces de Lb d'intérêt en santé et en alimentation humaine (Konig et Frohlich., 2009).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), Les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum XIII des Firmicutes, la Classe des Bacilliet l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (Wedajo, 2015) , et comprend les familles suivantes: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Dans le phylum des Actinobactéries (Mora-Villalobos et al., 2020).

D'après Chen et al (2013), Il existe plus de 500 espèces de bactéries lactiques classées sous forme de genres répartis en six grandes familles :

- **Lactobacillaceae** qui comprend les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.
- **Aerococcaceae** qui comprend les genres *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* et *Ignavigranum*.
- **Carnobacteriaceae** qui comprend les genres *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granlucateella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus* et *Trichococcus*.
- **Enterococcaceae** qui comprend les genres *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.
- **Leuconostocaceae** qui comprend les genres *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- **Streptococcaceae** qui comprend les genres *Lactococcus*, *Lactovum* et *Streptococcus*.



**Figure 01 :** L’Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16s (Stiles et Holzapfel, 1997).

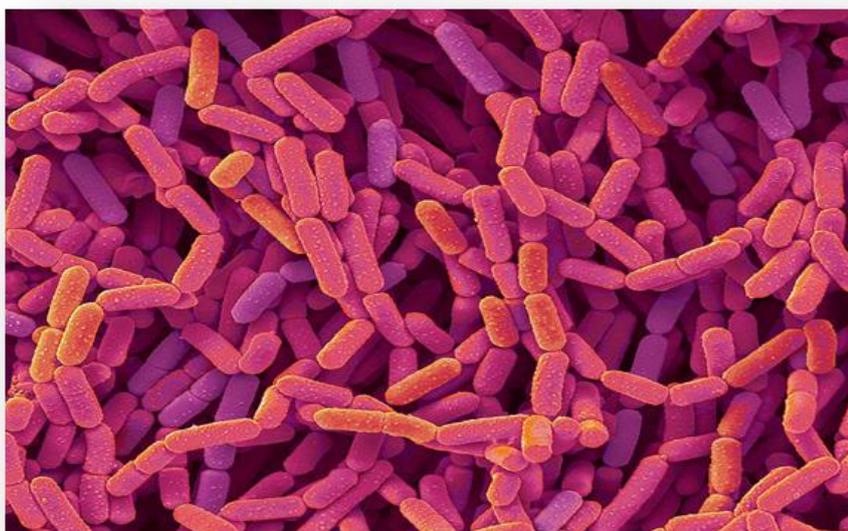
Le Tableau ci dessus montre Les différents genres de bactéries lactiques et leurs Principales caractéristiques.

**Tableau 02:** Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d’espèces
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 : 23 G2 : 16 G3 : 22
<i>Lactococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25

### 4.2.1 Le genre *Lactobacillus*

*Lactobacillus* c'est l'un des plus importants genres de bactéries lactiques. Il appartient à la famille des Lactobacillaceae contenant aussi les genres *Paralactobacillus* et *Pediococcus*. Il comprend 96 espèces et 16 sub-espèces qui sont adaptées à des endroits spécifiques et ne sont pas trouvées généralement en dehors de leurs habitats (De Vos et al., 2009). Ce sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes, de taille variable, anaérobies. Leurs exigences nutritionnelles sont complexes, leur température de croissance est de 2 à 53 °C, le pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,2. Leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47% (Guiraud, 1980). Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux, Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000 ; Menad, 2018).



**Figure 02 :** *Lactobacillus sp* (Anonyme 1,2020).

En se basant sur le caractère fermentaire, Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

- **Le groupe I:** regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts ils fermentent les hexoses en acide lactique exclusivement par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof, mais ils ne peuvent pas fermenter les pentoses et le gluconate (De Vos et al., 2009).

- **Le groupe II:** renferme les lactobacilles homohétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof (**Kouakou et Thonart., 2011**).
- **Le groupe III:** regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui ils fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO<sub>2</sub>, via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate/phosphocétolase comme ils peuvent dégrader les pentoses (voie des pentoses phosphate) en acides acétique et lactique (**De Vos et al., 2009**)

**Tableau 03 :** Groupes des genres *Lactobacillus* (**Guiraud et Rosec., 2004**).

Groupe	Types fermentaire	Les espèces
<b>G1:</b> Thermobacterium	Homo-fermentaires	<i>Lb. Helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i>
<b>G2:</b> Streptobacterium	Homo-fermentaires	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sak</i>
<b>G3:</b> Betabacterium	Hétéro-fermentaires	<i>Lb. Fermentum</i> <i>Lb. brevis</i>  <i>Lb. Sanfransisc</i>

## 5. Propriétés technologiques des bactéries lactiques

L'utilisation des LAB pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

### 5.1. L'activité acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires (**Boullouf, 2017**). car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (**Bouhanna et Boussaa., 2017**). Elle résulte de la transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acides organiques, ce qui conduit à l'acidification du

produit. Elle conditionne pour une grande part l'aptitude du lait à la coagulation comme elle assure l'inhibition des microorganismes indésirables (**Corrieu et Luquet., 2008**).

Selon (**Allouache et al., 2017**).Les conséquences d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés .
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires .
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux .
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.
- Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Monnet et al., 2008**).

## 5.2. L'activité protéolytique

Les bactéries lactiques ont des capacités limitées pour la synthèse des acides aminés, elles possèdent un système protéolytique complexe capable d'hydrolyser les protéines alimentaires en peptides et acides aminés contribuant à la texture (**Savijoki et al., 2006**).

L'activité de protéolyse des bactéries lactiques permet l'hydrolyse des protéines en peptides qui sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases (**Farkey et al.,1995 ; Lynch et al., 1997**).Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique (**Hadef,2012**) .Dans le lait, la dénaturation des caséines laitières conduit a leur précipitation en petite flocons puis en caillée qui conduit à la coagulation du lait (**Belkheir,2017**).

## 5.3. L'activité aromatisante

Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurres, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Corrieu et Luquet., 2008**).

Les bactéries lactiques peuvent produire de nombreux composés aromatiques, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses Tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol,l'acétate, le formate, ...etc.) (**Corrieu et Luquet., 2008 ; Bourgeois et Larpent., 1994** ), la plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate,les plus importants sont l'acétoïne et le diacétyle ) (**Chemlal-Kheraz, 2013**).

L'acétoïne et le diacétyle sont nécessaires pour donner un goût aux produits fermentés, d'autres composés organiques tels que l'acide acétique et l'éthanol sont aussi importants pour l'obtention d'un produit à une saveur agréable (**Ghozilane, 2012**). Divers composés volatils et aromatiques interviennent dans la saveur, c'est principalement le lactose qui joue un rôle dans la formation de ces composés. Parmi ceux-ci, outre l'acide lactique qui confère un goût acidulé, c'est l'acétaldéhyde qui a été identifié comme le plus important des composés carbonyliques qui contribuent à l'arôme typique. Le diacétyle contribue à donner un goût délicat dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques (**Bouhanna et Boussaa, 2017**).

#### 5.4. Activité lipolytique

Les bactéries lactiques possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser divers esters d'acide gras, des substrats de tri-, di- et mono-acylglycerol (**Holzappel et Wood, 2014**). Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles (**Béal et al., 2008**), ces activités contribuent généralement au développement de différents saveurs (**Ortiz de Apodaka et al., 1993**). Cependant, la lipolyse est généralement faible dans le yaourt et elle est donc non significative en termes de saveur. Généralement, les propriétés lipolytiques faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Corrieu et Luquet, 2008**). Les enzymes lipolytiques sont produites au cours de la phase exponentielle de croissance, la production est fortement influencée par les conditions de croissance (**Kenneally et al., 1998**).

#### 5.5. L'activité antibactérienne

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Chentouf, 2015**).

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al., 2005**). Parmi ces composés :

##### 5.5.1 Les acides organiques

Les bactéries lactiques produisent plusieurs substances antimicrobiennes telles que les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique et acide caproïque) (**Messens et De Vuyst, 2002**). 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**).

Les principaux composés antimicrobiens résultant du métabolisme des bactéries lactiques après fermentation des glucides sont constitués par les acides organiques. Leur effet inhibiteur est principalement causé par la forme non dissociée de la molécule, qui se diffuse à travers

la membrane cellulaire vers le cytoplasme plus alcalin et interfère avec les fonctions métaboliques essentielles (**Das et Goyal, 2012**).

Ainsi, Les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux principaux groupes :

- Les composés de faible masse moléculaire <1000 Da, comprenant toutes les substances antimicrobiennes produites par les LAB sauf les bactériocines. Elles ont un large spectre .
- Les protéines antimicrobiennes ou bactériocines avec un poids moléculaire >1000 Da , Elles ont une spécificité d'action relativement étroite contre les organismes apparentés et d'autres bactéries à Gram positif (**Collado et al., 2010; Suskovic et al., 2010**).

### 5.5.2 Le peroxyde d'hydrogène

Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) : il est considéré comme un facteur majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (**Klaenhammer et al., 1994**), peut être expliqué cette effet antimicrobien par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde ( $O_2^-$ ) .et le groupement hydroxyle (OH), il a également la capacité de détruire l'ADN bactérien (**Leonard, 2013**).

### 5.5.3 Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétéro fermentaires synthétisent du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) comme métabolite secondaire, Cependant, le  $CO_2$  peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de  $CO_2$  dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Bellil, 2013**), De plus, l'accumulation du dioxyde de carbone dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (**Leonard, 2013**).

### 5.5.4 Le diacétyl

Les bactéries lactiques produisent Le diacétyl ( $C_4H_6O_2$ ) qui est un composé aromatique par (LAB) par fermentation du citrate, et qui est responsable de la saveur beurrée des produits laitiers cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne (**Lanciotti et al., 2003**). Le diacétyl inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine. Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Hansal, 2015**).

Le mécanisme d'action du diacétyl n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (**Leonard, 2013**).

### 5.5.5 La production d'antibiotique (reutéline)

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde HPA) est une substance antimicrobienne produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney et al., 1998).

Deux principales hypothèses ont été proposées :

- La première serait que la reutérine pourrait inactiver les protéines et autres petites molécules présentant ces fonctions.
- Une deuxième hypothèse serait que le composé dimérique de HPA pourrait interférer avec la ribonucléotidase réductase (enzyme universelle impliquée dans la synthèse d'ADN), ceci conduisant à la mort cellulaire (Samot, 2012).

### 5.5.6 Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire, qui sont des composés protéiniques produits par bactéries Gram positives et Gram négatives (SIDHU et NEHRA, 2017).

Selon **klaenhammer (1988)**, Proposer une définition qui le plus largement acceptée qui considère les bactéries telles que les protéines, ou les complexes de protéines, à activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice (**Dortu et Thonart., 2009**). Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria* (**Dortu et Thonart., 2009**). Il a également un mode d'action bactéricide ou bactériostatique contre des espèces étroitement apparentées (**Jaya Chitra et Siva Kumar., 2018**).

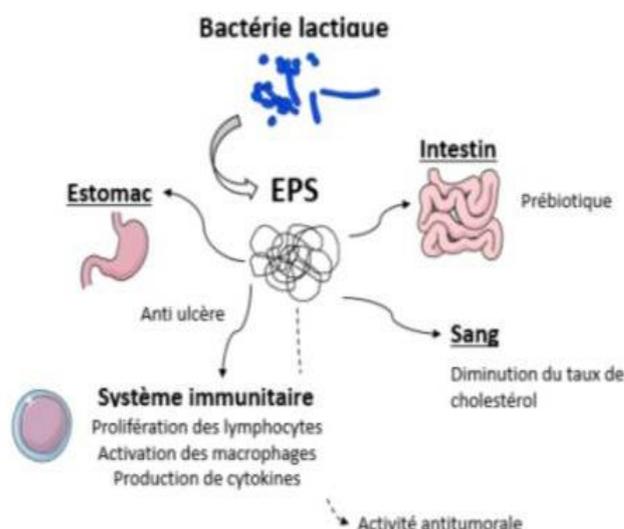
Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**Savijoki et al., 2006**).

### 5.6 La synthèse des exo-polysaccharides (EPS)

Les Exopolysaccharides sont des polymères de carbohydrates produits par les bactéries lactiques. Ils contiennent systématiquement et majoritairement du glucose et du galactose et de petites quantités d'arabinose, de mannose, de rhamnose et de xylose. Ces polymères hydrophiles de haut poids moléculaire, varie de  $3 \cdot 10^4$  à  $10^5$  Dalton, ont des propriétés épaississantes et gélifiantes qui modifient fortement la texture des milieux où ils sont excrétés (**Corrieu et Luquet., 2008**), sont des agents thérapeutiques potentiels, ils ont la capacité de réduire le taux de cholestérol sanguin diminuant ainsi le risque de maladies cardiovasculaires. En industrie alimentaire ils ont une grande importance ; ils sont utilisés comme viscosifiant, stabilisants, émulsifiants, gélifiant et édulcorants (**Das et Goyal, 2012**).

Les bactéries lactiques peuvent synthétiser des polysaccharides de surface. Ces polysaccharides sont soit excrétés dans leur milieu environnant, et sont appelés exo-

polysaccharides (EPS). Soit, ils restent attachés à la surface de la cellule sous forme de capsules et sont appelés polysaccharides capsulaires (PSC) ( **chen et al ., 2013** ), sont des polymères de sucres classés en deux catégories : les hétéro-polysaccharides (HePS) et les homo- polysaccharides (HoPS) (**chang et al., 2011**), Cette propriété est utilisée principalement pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés. Ainsi, la production d'exopolysaccharides par les LAB, lors de leur développement dans le lait évite l'augmentation du taux protéique du produit ou d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que des texturants et des épaississants, lors de la production de yaourt (**Corrieu et Luquet., 2008**).



**Figure 03** : Représentation schématique des possibles effets bénéfiques des EPS au niveau de l'organisme humain d'après (**chang et al., 2011**).

## 6. Application industrielles des bactéries lactique

Les bactéries lactiques jouent un rôle important en plusieurs secteurs tel que: l'industrie alimentaire, pharmaceutique, l'agroalimentaire et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques (**Belyagoubi, 2014**). Et a une histoire longue dans la production d'aliments et boissons fermentés vue leur production d'acides organiques, éthanol, composés aromatiques, exopolysaccharides, et plusieurs enzymes, ce qui améliore la texture, et contribue au profil sensoriel agréable du produit final (**Leroy et De Vuyst, 2004**).

### 6.1 Domaine alimentaire

Les classes de bactéries lactiques sont étroitement liées à l'environnement humain, elles sont classiquement impliquées dans de nombreux processus de fermentation alimentaire seules ou

avec un groupe de micro-organismes. (conversion du lait, fermentation des boissons, salage, fermentation des végétaux), La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des BL utilisée dans les industries alimentaires. Les BL interviennent par fermentation des substrats, en transformant les glucides en acide lactique (**Mayra- Makinen et Bigret., 2004**).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries qui possèdent le "statut GRAS" ce qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires. (**Hassaine, 2013**), ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins (**Axelsson, 2004**), participent également à la texture (production d'extrapolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers (**Moroni, 2007**).

Les bactéries lactiques interviennent essentiellement dans deux étapes de fabrication des fromages qui sont la coagulation et l'affinage (**Ray, 2018**).

Dans industrie alimentaire Les souches utilisées en doivent répondre à certains critères :

- Absence de pathogénicité ou activité toxique .
- La capacité d'améliorer les caractéristiques.
- Organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Ababsa, 2012**).

**Tableau 04** : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et

Exemples des espèces prédominantes (**McKay et Baldwin., 1990**).

Applications	Espèces utilisées
Fermentations des végétaux	<i>Ln. Mesenteroides</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Lb. plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb. Plantarum</i> <i>P. acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Lb. delbruekii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de Soja	<i>Lb. Delbruekii</i>

	<i>P. soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lb. plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lb. Acidophilus</i> <i>Lb. casei</i>
Pain au levain	<i>Lb. Plantarum</i> <i>Lb. Brevis</i> <i>Lb. Sanfranciscensis</i> <i>Lb. fermentum</i>
Biscuits	<i>Lb. Plantarum</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. Leichmannii</i> <i>Lb. casei</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. lactis subsp lactis</i> <i>Lc. lactis subsp cremoris</i> <i>Lc. lactis subsp latis biovar diacetylactis</i> <i>Ln. mesenteroides subsp cremoris</i> <i>Ln. lactis</i> <i>St. thermophilus</i> <i>Lb. delbruekii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i>

## 6.2 Domaine médical

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif des bactéries lactique il joue également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al.,2008**).Elles sont utilisées dans les traitements de certains affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. Ainsi pour la prévention des gastroentérites nosocomiales chez les nourrissons, des propriétés anticoncérigènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium* difficile et *Heilicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chronique de l'intestin (**Belarbi, 2011**).

Dans des études récentes, les bactéries lactiques ont démontré leur potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée.

L'espèce *Lactobacillus acidophilus* sont plus particulièrement utilisées comme produits pharmaceutiques pour rétablir ou maintenir la flore intestinale (**Marteau, 1994**).

Parmi leurs rôles bénéfiques sur la santé :

- Elles élaborent des enzymes qui viennent en aide au métabolisme de leur hôte, plus particulièrement pour les individus déficients en lactase.
- Leurs propriétés anti-cholestérol interviennent en diminuant le taux de cholestérol sérique.
- Elles peuvent réduire les chances d'apparition du cancer du côlon en éliminant les substances pro-carcinogènes et en intervenant sur les enzymes fécales susceptibles de transformer les substances pro-carcinogènes en substances carcinogènes .
- Elles interviennent sur la suppression des tumeurs par activation des macrophages.

### 6.2.1 Les bactéries lactiques comme probiotiques

Les probiotiques sont définis comme tous microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante exercent un effet potentiellement bénéfique sur la santé de l'hôte par amélioration des propriétés de la flore intestinale (**Salminen et al., 2004**). Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en générale l'intestin et d'autre part agir (**Butel, 2014**).

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*).

*Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt (**Makhloufi., 2012**).

**Tableau 05:** Effets positifs des probiotiques sur la santé humain  
(Esther Izquierdo., 2009).

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la $\beta$ -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale  -Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	-Résistance à la colonisation par des pathogène  -Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	-Modulation de la flore intestinale  -Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol  -Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	-Stimulation du système immunitaire  -Production de composés antimutagénique  -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques  -Dégradation la carcinogènes  -Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

### 6.3 Biopréservation

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde

d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) , La libération des acides organique dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne.

Actuellement la seule bactériocine autorisée en temps qu'additif alimentaire est la Nisine. Elle est autorisée comme agent de conservation dans les aliments tels que les fromages affinés et les fromages fondus la crème caillée et la mascarpone (Matamoros, 2008).Elles sont utilisées pour améliorer les caractéristiques organoleptiques des produits fermentés (Dortu et Thonart., 2009).

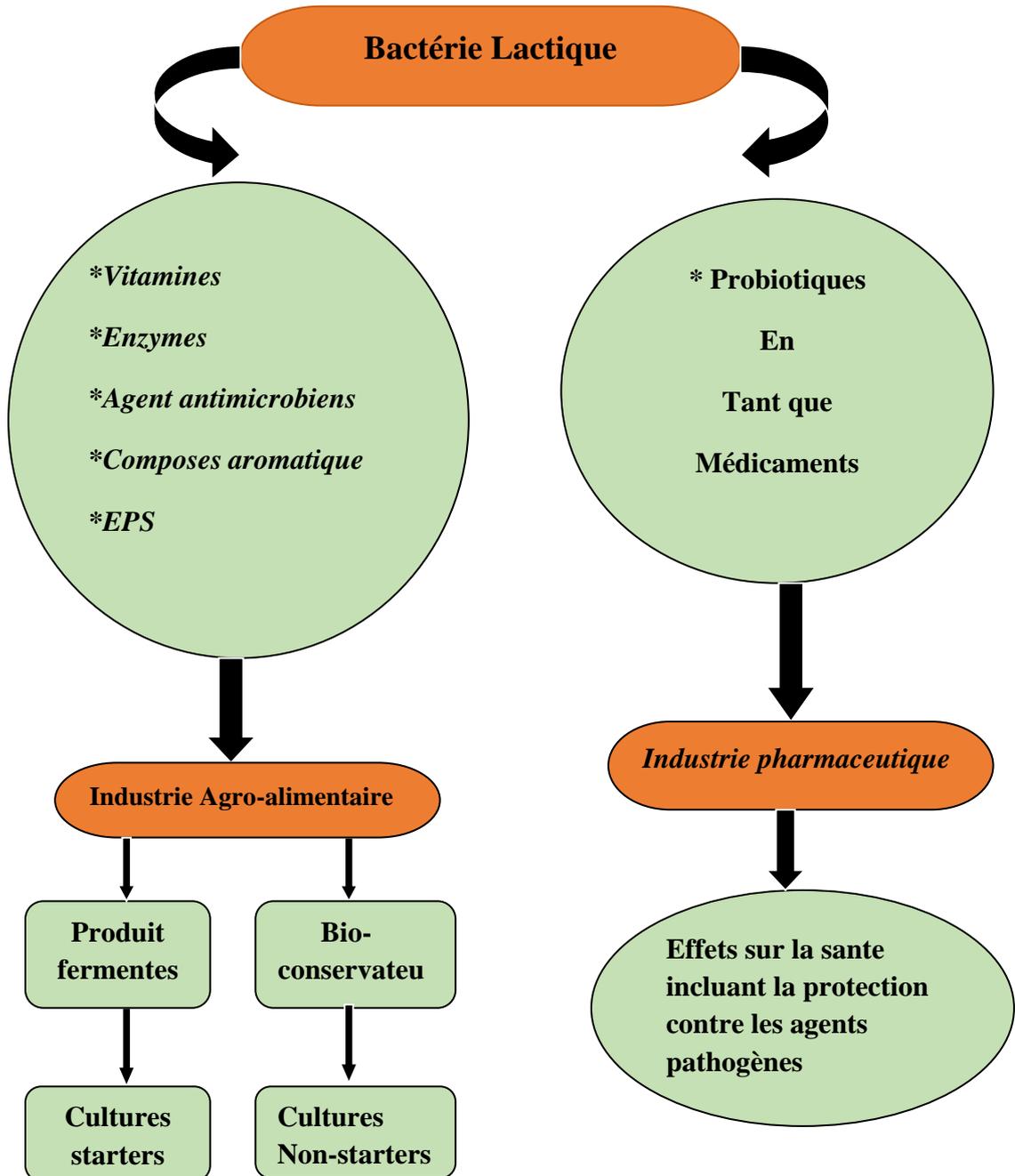


Figure 04: Utilisation industrielles des bactéries lactique (Florou- Paneri et al., 2013).

## 7. Identification moléculaire des bactéries lactique

L'identification des espèces de LB peut être difficile à réaliser par des méthodes biochimiques en raison du grand nombre d'espèces qui existent. Il est essentiellement basé sur des tests de fermentation de sucres (**Bahri, 2014**), cette technologies moléculaires utilise des pour évaluer des régions spécifiques d'un génome bactérien et déterminer de manière unique à quel genre, espèce ou souche appartient le micro-organisme (**Gremaud et al., 2008**).

Les techniques moléculaires basées sur l'utilisation de l'ADN (**Tableau 06**) comme G+C%, l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées.

**Tableau 06** : Techniques utilisées pour l'identification génotypiques des bactéries lactiques (**Temmerman et al., 2004**).

Techniques	Pouvoir discriminatoire
RFLP	Les espèces et les souches
AFLP	Les espèces et les souches
PAPD-PCR	Les espèces et les souches
Rep-PCR	Les espèces et les souches
PFGE	Les espèces et les souches
Ribotypage	Les espèces et les souches
DGGE et TGGE	Les espèces et les souches
Séquençage	Les genres et les espèces
Hybridation ADN-ADN	Les genres et les espèces

### 7.1 Détermination du pourcentage Guanine+ Cytosine (%G+C)

Selon **Johnson, (1984)**, le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage molaire de bases guanine et cytosine (%G+C), ce pourcentage varie chez les bactéries de 25% à 75%(25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micrococcus luteus*) (**Muto et al., 1987**).

## 7.2 Séquençage de l'ADN ribosomal 16S

Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue donc les séquences ribosomiques reflètent le génotype des bactéries (**Vandamme et al., 1996**). C'est un outil standard pour les études phylogénétiques et taxonomiques des bactéries en raison de la conservation de ce gène entre différentes espèces. C'est une méthode courante d'identification des souches bactériennes qui consiste à analyser la séquence de l'ADNr 16S codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) (**Mohania et al., 2008**).

Dans certains cas, l'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S (*Intergenic Spacer Region = ITS*) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr 16S lui-même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. pseudoplatarum* ou *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* peuvent être discriminées (**Berthier et Ehrlich, 1998**).

## 7.3 Amplification par PCR (Reaction de Polymérisation en Chaîne) de l'ADNr 16S

La Polymerase Chain Reaction (**PCR**) : est une technique de réplique ciblée in vitro qui a été conçue au début des années 80 par un chercheur américain, (**Kary Mullis, 1993**), permettant d'amplifier spécifiquement et de manière exponentielle une séquence d'ADN donnée.

L'ensemble des opérations pour un grand nombre d'échantillons (**Figure 10**), Il s'agit d'une réaction cyclique et chaque cycle comprend :

- dénaturation de l'ADN à 95°C.
- hybridation des amorces P1 et P2 à (40°C-60°C).
- synthèse du brin complémentaire par l'enzyme ADN Polymérase à (72°C) (**Yves Rosuel, 1994**).

### 7.3.1 Les principales étapes de la PCR

#### ➤ Dénaturation

Elle consiste en une séparation des deux brins de l'ADN matrice en deux fragments simples brins. Elle est réalisée grâce à une élévation de la température, en général à 94°C pendant un temps variable. Cette élévation de température rompt les liaisons hydrogène entre les bases libérant ainsi les deux brins (**Thiao, 2005**).

#### ➤ Hybridation des amorces

Dans cette étape en la fixation des amorces sur l'ADN matrice simple brin. Elle se réalise suite à une baisse de la température jusqu'aux environs de 55°C. La température d'hybridation varie en fonction du pourcentage de GC des amorces utilisées. Les amorces

contenues dans le mélange réactionnel se fixent sur l'ADN matrice simple brin au niveau des zones qui leur sont complémentaires.

Plus les amorces sont parfaitement complémentaires de leur site de fixation, plus elles sont stables et solidement fixées.

C'est sur cette portion de l'ADN en double brin que la polymérase va pouvoir se fixer et débiter la synthèse du brin complémentaire au brin matrice (**Thiao, 2005**).

#### ➤ **Polymérisation**

Cette étape est réalisée à 72°C qui est la température idéale de fonctionnement de la polymérase.

De plus, cette élévation de température rompt les hybridations non spécifiques d'amorce, le résultat est la synthèse complète du brin de l'ADN complémentaire du brin matrice par la polymérase.

Cette dernière attachée à l'extrémité 3' de l'amorce ajoute des dNTPs sur cette extrémité réalisant ainsi la synthèse du nouveau brin. Après chaque cycle, le nombre de copies de départ est doublé (**Thiao, 2005**).

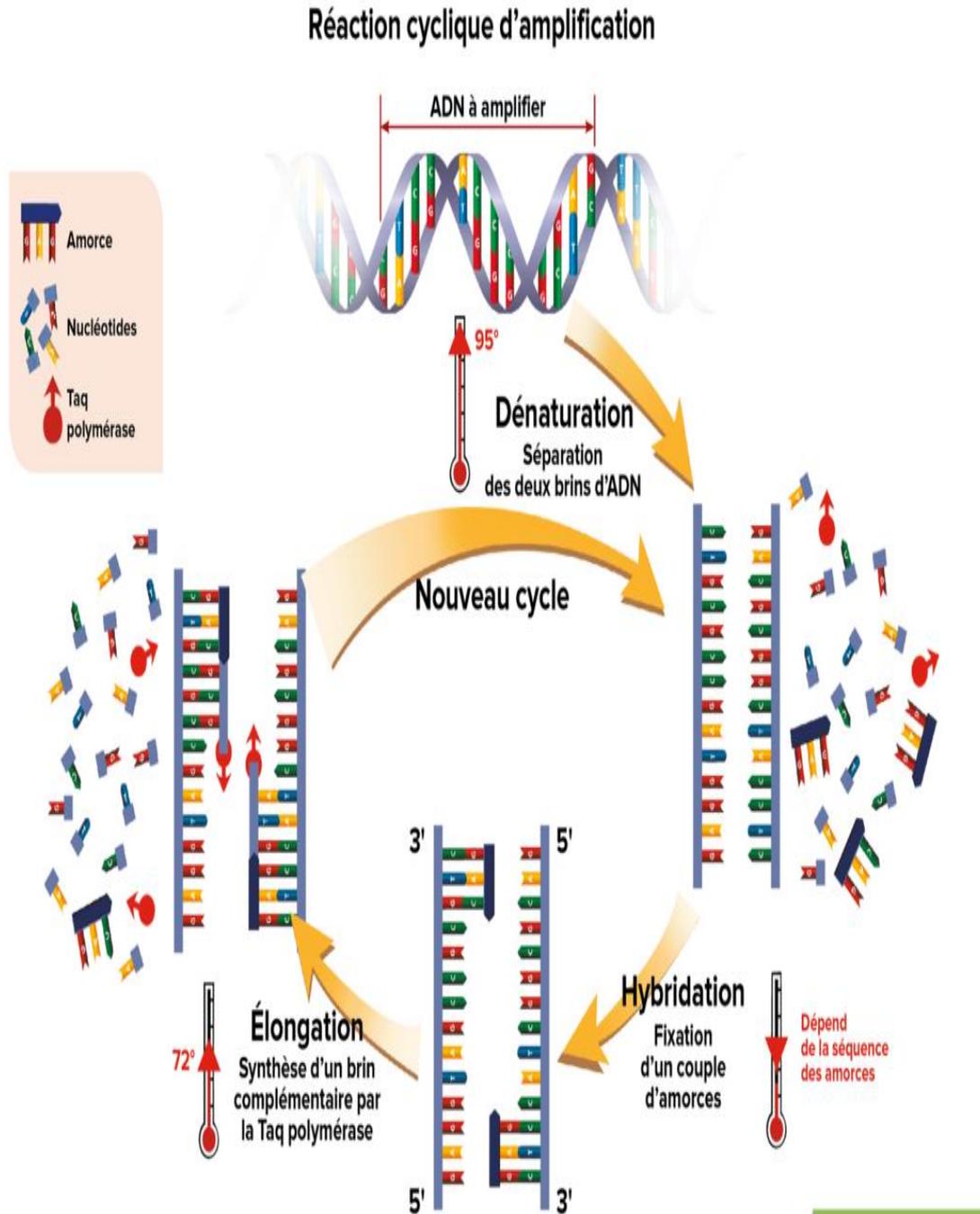


Figure 05 : Les étapes de déroulement de la PCR (Poitras et Houde., 2002).



**GÉNÉRALITÉS**

**SUR**

**LE LAIT**

## 1. Définition du lait

Le lait est un liquide blanc mat, opaque, légèrement visqueux, a une odeur très faible, une saveur douce être faiblement sucrée, sécrété des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis. La composition du lait et les caractéristiques physicochimiques varient selon les espèces et les races animales. (Martin et Coulon, 1995 ; vignola, 2002).

Durant le congrès international de la répression des fraudes à Genève en 1988, le lait a été défini comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum. (Pougheon et Goursaud, 2001).

Le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. (Favier, 1985). Il est nécessaire à tous les âges de la vie, non seulement pour sa richesse incontournable en calcium mais également pour sa contribution à la couverture des besoins en protéines de haute valeur biologique, en vitamines, en oligo-élément et en eau (Derby, 2001).

## 2. Les phases de Lait

Le lait est constitué de quatre phases qui sont en suspension les unes avec les autres.

- Une phase grasse ou lipidique sous forme d'une émulsion de matière grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A et D).
- Une phase colloïdale constituée de caséines en suspension sous forme de micelles.
- Une phase aqueuse appelée lactosérum qui contient des constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamine B, sels minéraux, azote non protéique).
- Une phase gazeuse composée d'O<sub>2</sub>, N et de CO<sub>2</sub> qui représente environ 5% du volume de lait (Fredot, 2006).

## 3. Composition chimique du lait

D'une manière générale, Le lait contient plus de 100 composants différents (Wattiaux, 1997), la composition du lait varie selon les espèces animales mais aussi selon différents facteurs tels que l'individualité, la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison, l'âge et la zone géographique.

Selon Pougheon et Goursaud (2001), les principaux constituants du lait par ordre croissant sont :

- ✓ L'eau, très majoritaire.
- ✓ Les glucides principalement représentés par le lactose.
- ✓ Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras.

- ✓ Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire.
- ✓ Les protéines, caséines rassemblées en micelles, les albumines et globulines solubles.
- ✓ les enzymes, les vitamines et les oligoéléments (**Tableau 01**).

**Tableau 07** : La composition chimique du lait (Alais et Linden, 1997).

Eléments	Composition (g /l)	Etat physique des composants
<b>Eau</b>	905	Eau libre (solvant) plus eau liée (3.7%)
<b>Glucides</b> (lactose)	49	Solution
<b>Lipides</b>	35	Emulsion des globules gras (3 à5 um)  Insaponifiables
Matière grasse proprement dite	34	
Lécithine ( <b>phospholipides</b> )	0.5	
( <b>stérois,carotènes,tocophérols</b> )	0.5	
<b>Protides</b>	34	Suspensions micellaires phosphocaseinate de calcium (0.08 à0.12um)  Solution (colloïdale)
Caséine	27	
Protéines « soluble » ( <b>globuline, albumines</b> )	2.5	
Substance azotée non protéique	1.5	
<b>Sels</b>	9	
De l'acide citrique(en acide)	2	
De l'acide phosphorique ( <b>P<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> )	2.6	
De l'acide chlorhydrique ( <b>Na Cl</b> )	1.7	
<b>Constituants divers</b> (vitamines, enzymes ,gazs dissous)	traces	
<b>Extrait sec total</b>	127	
Extrait sec non gras	92	

**Tableau 08** : Composition moyenne du lait de différentes espèces (Lebeuf et al., 2002).

Animaux	Eau (%)	Protéines (%)	Matières grasses (%)	Glucides (%)	Minéraux
Vache	87,5	3,3	3,3	4,7	0,7
Chèvre	87,0	3,8	3,4	4,4	0,9
Brebis	81,5	5,3	7,4	4,8	1,0
Chamelle	87,6	5,4	2,9	3,3	0,7
Jument	88,9	1,9	2,5	6,2	0,5

### 3.1 Eau

Selon (Dahlborn et al., 1997) l'eau est le composé majoritaire du lait, le constituant le plus important en proportion avec une teneur de 90%. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire permettant de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux, et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles de sérum. (Amiot et Lapointe, 2002).

### 3.2 Matière grasse

La matière grasse laitière est constituée essentiellement de triglycérides (98%). Les diglycérides, mono-glycérides et les acides gras libres sont naturellement présents en faibles quantités mais leur proportion peut augmenter en cas de lipolyse. (Chilliard et Lamberet, 1984 ; Jeantet et al., 2007)

Des phospholipides (1%) jouent un rôle énergétique important (9kcal/g). Une fraction insaponifiable (1%) est constituée en grande partie de cholestérol, glycérides partielles et d'acides gras libres (Jeantet et al., 2008, Amiot et al., 2002)

La matière grasse du lait est produite principalement à partir des acides gras volatiles (acides acétique et butyrique). Le premier est formé principalement à partir des glucides pariétaux des fourrages (cellulose) et le second à partir des glucides rapidement fermentescibles (sucre de betterave). Une partie de la matière grasse du lait provient de la mobilisation des réserves lipidiques de la vache (jusqu'à 60kg). Sous certaines conditions, des graisses alimentaires peuvent également contribuer à la formation de la matière grasse du lait (Stoll, 2003).

**Tableau 09** : Composition lipidique du lait (Grappin et Pochet., 1999).

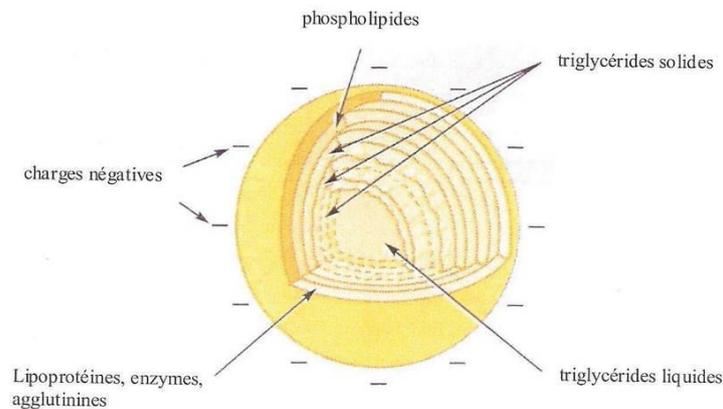
Constituants	Proportions de lipides du lait (%)
<b>Triglycérides 98</b>	98(%)
<b>Phospholipides</b>	01(%)
<b>Fraction insaponifiable</b>	01(%)

**A. Triglycérides** : Les triglycérides sont des esters du glycérol, c'est-à-dire qu'ils sont formés par condensation de trois molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol (Walstra,1999). Ils contiennent principalement :

- AG saturé (60-70 %) dont une proportion importante d'AG à pré élevée (C14-C16-C18).
- AG à chaîne courte (C4-C5) volatiles.
- AG mono-insaturés 25-30 %.
- Très peu d'AG Phosphorilés 2 à 5 %.

**B. Les Phospholipides du lait** : classés comme lipides complexes. Les phospholipides forment trois groupes principaux : les lécithines, les céphalines et les sphingomyelines ; leurs caractéristiques à la fois lipophiles et hydrophiles leur permettant de former des ponts entre la phase grasse et aqueuse. (Crayot et Lorient, 1998).

**C. Les Fractions insaponifiables** : regroupent l'ensemble des constituants de la matière grasse qui ne réagissent pas avec la soude ou la potasse pour donner des savons, et qui après saponification, sont insolubles dans l'eau ou en milieu alcalin tout en restant solubles dans les solvants organiques non miscibles dans l'eau. Ils regroupent principalement des stérols, les caroténoïdes dont carotène 0.15 mg/l,  $\beta$ -carotène les xanthophylles et les vitamines A, D, E et K, des Stérols à (0.3-0.4%) dont le cholestérol à (70mg/l, vitamine D 0.02 mg/l (Jean-Christophe, 2018).



**Figure 06:** Composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).

La matière grasse du lait a une importance considérable dans l'industrie laitière, puisque c'est l'un des paramètres de base du paiement du lait par les producteurs (Luquet, 1985).

### 3.3 Vitamines

Les vitamines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaires responsables de l'immunité, On les trouve en grande quantité dans le colostrum (Thapon, 2005). Des molécules plutôt complexes mais de tailles beaucoup plus faibles que les protéines. De structures très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes car elles jouent un rôle de coenzymes associés à une apoenzyme protéique (Adrian, 1987).

Selon Vignola (2002), les vitamines sont des substances biologiquement indispensables participant comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser.

Ils se divisent en deux parties par rapport à leur solubilité dans des milieux différents :

- Les vitamines liposolubles : Vitamine A (Axeophthol), Vitamine D, Vitamine E, Vitamine K, associées à la matière grasse (Jeant et al., 2008).
- Les vitamines hydrosolubles : Les complexes de vitamine B, vitamine B2 (Riboflavine), vitamine B3 ou P.P (acide nicotinique, niacine), vitamine B6 (Pyridoxine), vitamine B12 (Cobalamine), vitamine B1 (thiamine ou aneurine), Vitamine C (acide ascorbique) (Alias, 1984) voir (Tableau 04).

Tableau 10 : Composition vitaminique moyenne du lait (Amiot et *al.*, 2002).

<b>Vitamines</b>	<b>Teneur moyenne</b>
<b>Vitamine liposolubles</b>	
Vitamine A (+caroténes)	40µg/100ml
Vitamine D	2.4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	2µg/100ml
<b>Vitamines Hydrosolubles</b>	
Vitamine C (acide ascorbique)	2 mg/100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B6(pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0.45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5.5µg/100ml

Vitamine H(biotine)	3.5 µg/100ml

La présence de vitamines dans l'alimentation humaine et animale est essentielle à la croissance nutritionnelle, ce qui assure de meilleures performances aux petits comme aux grands dans leur organisme, leur nutrition, leur équilibre nerveux, leur activité visuelle et leur reproduction.

### 3.4 Enzymes

Les enzymes sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs. Une grande partie se retrouve dans la membrane des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes (**Pougheon, 2001**).

Selon **Vignola, 2002**, Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes: les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydase) et les oxygénases.

**Tableau 11** : Caractéristiques des principaux enzymes du lait ( **Vignola, 2002**).

Group d'enzyme	Classes d'enzyme	PH	Température(C°)	Substrats
<b>Hydrolases</b>	<b>Estérases</b>			
	Lipases	8.5	37	Triglycérides
	Phosphatase alcaline	9-10	37	Esters phosphorique
	Phosphatase acide	4.0-5.2	37	Esters phosphorique
	<b>Protéases</b>			

	Lysozyme	7.5	37	Parois cellulaire microbienne
	Plasmine	8	37	Caséines
<b>Déshydrogénases</b> <b>ou</b> <b>oxydases</b>	Sulfhydrile oxydase	7	37	Protéines ,peptides.
	Xanthine oxydase	8.3	37	Bases puriques
<b>Déshydrogénases</b>	Lactoperoxydase	6.8	20	Composes réducteurs +H2O2
	Catalase	7	20	H2O2

Les enzymes jouent un rôle très important selon leurs propriétés :

- Enzymes lipase et protéase : hydrolyse des constituants originaux du lait avec des implications technologiques et sensorielles importantes pour le lait.
- Enzymes lactoperoxydase et lysozyme : Jouent un rôle antibactérien et apportent une protection limitée au lait.
- Certaines enzymes sont utilisées comme indicateurs de qualité hygiénique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyl estérase, qui sont des enzymes thermosensibles (**Linden, 1987**)).

### 3.5 Glucides

Les glucides sont des composants essentiels du lait dont le lactose .ils représentent environ 38% de la matière sèche (**Perreau, 2014**).

La molécule C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> du lactose est constituée d'un résidu galactose uni à un résidu glucose, c'est un disaccharide constitué par de l'alpha(α) ou bêta (β) glucose et bêta (β) galactose. Les molécules de lactose sont Synthétisées dans les cellules acini à partir du

glucose sanguin. Celui-ci est en grande partie produit par le foie (**Hodenet Coulon., 1991 ; Mathieu, 1998; Mathieu, 1999**).

Le lait contient deux types de glucides :

- Les glucides libres et dialysables (= les oligoholosides) .
- Les glucides combinés en glycoprotéines et non dialysables.

Les glucides sont présents sous forme de glycoprotéines et glycolipides (**Desjeux, 1993**) .On distingue selon un classement basé sur leur polarité électrique :

- Les glucides neutres : lactose, glucose, galactose .
- Les glucides azotés : glucosamine N-acétylée et galactosamine N-acétylée .
- Les glucides acides toujours liés aux glucides neutres ou azotés : acide sialique.(**Walstra, 1978**).

### 3.6 Sels organiques et minéraux

Le lait contient des quantités importantes de différents minéraux, il est riche en phosphore, calcium,, magnésium, sodium et chlorures potassium pour les cations et phosphate, chlorure et citrate pour les anions (**Gaucheron,2004** ).

Selon **Apfelbaum et al, 2004**, le lait contient peu de soufre, très pauvre en fer et en oligoéléments .Le phosphore et le calcium sont les principaux minéraux du lait (phosphore ; 90 mg /ml ; calcium ; 125 mg/100 ml). La teneur en sodium est en moyenne de 50 mg/100 ml, et celle de potassium en moyenne de 150 mg /100 ml.

**Tableau 12** : Composition minérale du lait de vache( **Jeantet et coll., 2007**).

Eléments minéraux	Concentration (mg.kg-1)
Calcium	1043-1283
Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	1323-2079

Sodium	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

Les sels minéraux sont divisés en deux parties :

- Une partie des sels minéraux se trouvent sous forme soluble.
- Et une partie se trouve dans la phase colloïdale insoluble en association avec les caséines (**Hupperts et Kelly., 2009**).

### 3.7 Protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes. et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers (**Jean Amiot et al., 2002**).

Selon **Roca-Fernandez, 2014**, Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales. Le 5% restant sont constitués d'acides aminés libres et de petits peptides d'azote non protéique, essentiellement de l'urée (0,3 à 0,4 g/l) mais aussi de la créatinine, de l'acide urique, incluant 90% de la matière azotée et forment des protéines suivant: lactalbumine, caséines, lactoglobuline.

L'analyse du lait par minéralisation, appelée méthode Kjeldahl; permet d'évaluer que 95% de la quantité totale d'azote présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3,2%. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée (**Marc et Girlebrt., 2013**).

Les protéines sont constituées de deux composants principaux: les caséines qui se précipitent lors de l'acidification du lait ou l'ajout de rénine, et les protéines du lactosérum contenant des protéines: acides, basiques et des facteurs antimicrobiens. (lysozyme, lactoferrines, immunoglobulines...) (**El-Hatmi et al., 2007; Farah et al., 2004**). La classification des protéines est illustrée dans le tableau 0.

Tableau 13: Classification des protéines du lait (Marc et Girlebrt., 2013).

Noms	% de la protéine	Nombre d'AA
<b>Caséines</b>	75-85	
Caséine $\alpha$ S1	39-46	199
Caséine $\alpha$ S2	8-11	207
Caséine $\beta$	25-35	209
Caséine k	8-15	169
Caséine g	3-7	
<b>Protéines du lactosérum</b>	15-22	
$\beta$ -Macroglobuline	7-12	162
$\alpha$ -Lactalbumine	2-5	123
Sérum-albumine	0.7-1.3	582
Immunoglobulines (G1, G2, A, M)	1.9-3.3	-
- Protéases-peptones	2-4	-

### 3.8 Les caséines

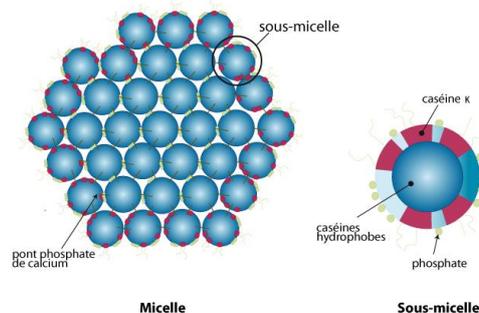
Selon **Jean et Dijon (1993)**, la caséine est un polypeptide complexe, résultant de la polycondensation de différents aminoacides, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine de masse molaire qui peut atteindre  $56000 \text{ g mol}^{-1}$ .

La caséine native a la composition suivante : protéine 94% , calcium 3% , phosphore 2,2% , acide citrique 0,5% et magnésium 0,1 % (**Bylund, 1995 ; Ghaoues, 2011**).

Les caséines forment près de 80% de toutes les protéines présentes dans le lait. Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle. La taille des micelles se situe entre 100 et 500 nm ; avec un diamètre moyen près de 180 nm et elle varie principalement selon l'espèce animale, la saison, le stade de lactation, accessible à la présure. Il s'agit d'une protéine de 169 acides aminés, phosphorylé (Serine 149) comportant 2 variant génétiques A et B (**Eigel et al., 1984; Lenoir, 1985**).

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

- **La caséine  $\alpha$ S1** : Est la protéine la plus abondante du lait puisqu'elle représente environ 40% des caséines. C'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA pour 23 614 g/mol.
- **La caséine  $\alpha$ S2** : Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de aS2 ou aS3 ou aS4 ou aS6 selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 25390 g/mol.
- **La caséine  $\beta$**  : Est une protéine qui constitue environ 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 acides aminés et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine  $\alpha$ S1.
- **La caséine K** ne représente qu'environ 12% des caséines (**Martin et al., 1996**).



**Figure 07** : Représentation schématique de la micelle du lait ( **Marc et Girbert., 2013**).

### 3.9 Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont des protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riche en acides aminés, en soufre, en lysine et tryptophane, Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique (**Thapon, 2005**). Les Protéines du lactosérum Elles représentent 20 % des protéines du lait de vache. Les deux protéines majoritaires, en poids, sont la  $\beta$ -lactoglobuline (44 % des protéines du lactosérum) et l' $\alpha$ -lactalbumine (20 %) (**Blanc , 1982**).

- **La bêta-lactoglobuline (BLG) (60%)** : est la plus importante des protéines du sérum
- **l'alpha-lactalbumine (20%)** : est un des composants de la lactose-synthétase et à ce titre joue un rôle essentiel dans la synthèse du lactose. Elle se trouve dans le lait de toutes les espèces animales.

- **l'albumine sérique (7%) :** « *Sérum Albumine Bovine (SAB)* » Représente environ 7% des protéines du sérum. il est constituée de 582 résidus d'acides aminés. Comptant un seul variant génétique A et identique au sérum albumine sanguine. Il est un bon indicateur d' inflammation de la mamelle chez les femelles des animaux (**Vignola, 2002**).
- **Les immunoglobulines (13%) :** Les immunoglobulines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire responsable de l'immunité ,des protéines du lactosérum les plus sensibles à la dénaturation thermique .(Thapon, 2005).
- **Protéases-peptones :** C'est un groupe hétérogène issu de la protéolyse par la plasmine de la caséine  $\beta$  (**Debry, 2001**).

Certaines protéines du lactosérum sont synthétisées dans la glande mammaire ( $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline) et d'autres proviennent du sang (sérum albumine, lysozyme,...)

Ces protéines ont différents rôles. A titre d'exemple :

- La  $\beta$ -lactoglobuline a un rôle nutritionnel.
- L' $\alpha$ -lactalbumine et la plasmine ont un rôle enzymatique.
- Les immunoglobulines ont un rôle protecteur.
- La lactoferrine permet le transport d'ions inorganiques (**Ribadeau-Dumas, 1991**).

## 4. Lait De Vache

### 4.1 Définition du Lait de vache

Le lait de vache est C'est le lait produit par la vache depuis la naissance de son veau, afin de le nourrir, il a été considéré comme un aliment de base dans de nombreux régimes alimentaires et toujours un mélange, obtenu de la traite de plusieurs animaux. Cette pratique tend à réduire fortement l'importance des variations individuelles (Steijns, 2008).

Le lait est ainsi le seul aliment des nouveaux nés mammaliens et il y a autant des laits différents qu'ils existent de mammifères au monde (Roudaut et Lefrancq., 2005).

### 4.2 Composition du Lait de vache

Le lait de vache est un mélange complexe constitué à 90% d'eau (Courter Leymarios.,2010), il vu être un substrat très favorable au développement des microorganismes Parce qu'il contient des graisses, des sucres, du lactose, des protéines solubles, des sels minéraux(calcium (Ca), phosphore, zinc) , des vitamines (vit) hydrosolubles (B2 et B12)et son pH est de 6,6.(Guiraud et Galzy, 1980 ).

D'un point de vue nutritionnel, le lait constitue la principale source alimentaire de calcium et de phosphore (Mahaut et al., 2003) , le lait de vache est composé de 04 éléments majeurs :les protéines, les Glucides , les lipides et les Minéraux

**Tableau 14** : Composition générale du lait de vache (Vingola, 2002).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	58,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6 – 5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8
Constituants mineures : enzyme ; vitamines ; pigments ; cellules diverses ; gaz		

Tableau 15 : Comparaison moyenne du lait de vache (Beal et Sodini, 2003).

<b>Composant</b>	<b>Teneur exprimées en g pour 100</b>
<b>Eau</b>	87,8
<b>Lactose</b>	4,8
<b>Matière grasse</b>	3,9
<b>Matières azotées</b>	3,8
<b>Caséines</b>	2,6
<b>Protéines sériques</b>	0,5
<b>Azote non sérique</b>	0,1
<b>Minéraux</b>	0,7
<b>Calcium</b>	0,12
<b>Phosphore</b>	0,09
<b>Potassium</b>	0,14

### 4.2.1 Eau

Le lait de vache est constitué de nombreux composés dont le plus abondant est l'eau (87%), dans laquelle sont dispersés tous les autres éléments (Mathieu, 1998).

### 4.2.2 Vitamines

Le lait de vache constitue une source alimentaire importante en riboflavine (vitamines B2) pour l'homme (Mittaine, 1962), contient des vitamines liposolubles (A, D, E et K) et des vitamines hydrosolubles du groupe B. Les teneurs vitaminiques dépendent beaucoup de l'alimentation. Les concentrations en vitamines du groupe B sont plus stables car synthétisées par les bactéries du rumen (Perreau, 2014 ; Ennuyer et Laumonnier., 2013).

**Tableau 16 :** Teneur en vitamines de lait de vache mg/litre (FAO, 2002).

vitamines	Vache
B <sub>1</sub>	0.42
B <sub>2</sub>	1.72
B <sub>6</sub>	0.48
B <sub>12</sub>	0.0045
Acide nicotinique	0.92
Acide folique	0.053
C	18
A	0.37
<i>B-carotène</i>	0.21

### 4.2.3 Protéines

Selon Foroutan et al., (2019). Les protéines du lait ont une efficacité nutritionnelle élevée, elles ont l'avantage de posséder une bonne valeur biologique, c'est-à-dire un bon équilibre en acides aminés (AA) indispensables et une digestibilité très élevée (90 à 96% pour leur coefficient de digestibilité apparente).

Le lait de vache contient trois sortes de protéines :

- « **La caséine entière** » : c'est le complexe des protéines phosphorées le plus abondant dans le lait, appelée aussi "protéine insoluble". Elle précipite seule

lorsqu'on acidifie le lait à pH 4,6 ou lorsqu'on fait réagir un enzyme spécifique: la présure.

- « **Les protéines du lactosérum** » : appelées aussi “protéines solubles”. C'est un mélange d'holoprotéines (ne contenant que des acides aminés) et de glycoprotéines (contenant également des glucides). Elles sont insolubilisées par la chaleur avant 100°C et ont les propriétés des albumines et des globulines.
- « **Les protéoses-peptones** » : ce sont des substances ayant une grandeur moléculaire intermédiaire entre celles des protéines et celles des peptides. Elles sont peu abondantes dans le lait (Alias, 1984).

**Tableau 17:**Teneur moyenne en g/L et distribution des protéines dans le lait de vache (FAO, 1998).

Protéine	Vache
$\alpha$ -lactalbumine	1,5 (45%)
$\beta$ -lactoglobuline	2,7 (25%)
Albumine sérique	0,3 (5%)
Immunoglobulines	0,7 (12%)
Protéase-peptone	0,8 (13%)

#### 4.2.4 Matière grasse

Les graisses du lait sont, également, composées de molécules bioactives (AG oméga 3, gangliosides, acide linoléique conjugué) qui peuvent contrecarrer l'effet des AGS, au sein d'une alimentation équilibrée (Gibson, 2011), et caractérisée par une grande variété d'acide gras qui va de l'acide butyrique (C4) à l'acide béhénique (C22).

La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est classée en deux catégories en fonction de la longueur de la chaîne carbonée et le nombre de doubles liaisons :

- Acide gras insaturés : y a deux classes, mono-insaturés et poly-insaturés ; le lait de brebis contient 27% par contre le lait de chèvre 30% et le lait de vache 35% (Courtet, 2010).

La Composition en lipides de lait de vache est représentée dans le tableau suivant.

Tableau 18 : Composition en lipides de lait de vache (Chilliard, 1984).

composition (%)	Lait de vache
Triglycérides	98
Glycérides partielles	0.5
Cholestérol	0.3
Phospholipides	0.9
Acides gras libres	0.4

#### 4.2.5 Glucides

Les glucides sont les constituants les plus importants quantitativement après l'eau et représentent dans le lait environ 38% de la matière sèche (Perreau, 2014). C'est un disaccharide, c'est-à-dire qu'il est composé de deux sucres simples : le glucose et le galactose. Il est un fournisseur d'énergie (Regula et al., 2011).

Le lactose est quasiment le seul glucide du lait de vache et représente 99% des glucides du lait de monogastriques. Sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/l dans le lait de vache (Hoden et Coulon., 1991).

#### 4.2.6 Minéraux

Le lait de vache et les produits laitiers sont des sources précieuses de minéraux essentiels (en moyenne 10 à 20% de l'apport alimentaire quotidien) (Zamberlin et al., 2012).

Les minéraux sont entièrement apportés par notre alimentation, et jouent surtout un rôle structural fonctionnel.

Le lait de la vache est riche en calcium et en phosphore; leur teneur est de :

- Calcium =117 Mg /100 g.
- Phosphore =93 Mg /100 g (Romain et al., 2008).

Tableau 19: Teneur en élément de lait de vache (FAO, 2002).

Minéraux mg/litre	Calcium	Phosphore	Magnésium	Potassium	Sodium	Fer	Chlore
Vache	1250	950	120	1500	520	0.2à 0.5	1.00

## 5. Lait De Brebis

### 5.1 Définition du Lait de Brebis

Le lait des brebis laitières est un aliment précieux d'une grande valeur nutritive (acides gras, substances minérales, vitamines), avec une densité nutritive élevée représentée par la matière grasse, protéines et sa teneur en extrait sec (18%) (Maurer et al., 2007). Le lait de brebis permet également la fabrication de laits acidifiés. Il existe un grand nombre de variétés de fromages au lait de brebis susceptibles d'être maturés de façons très différentes.

Lait de brebis est le lait maternel produit par la brebis, et qui se destine à l'agneau. On l'utilise, tout comme le lait de vache, dans l'alimentation humaine. C'est ce lait qui sert à la confection de certains fromages méditerranéens comme la feta, la ricotta ou encore, le roquefort.

### 5.2 Composition du Lait de Brebis

#### 5.2.1 Eau

Selon Fredot (2005), La quantité d'eau dans le lait de brebis est faible, estimée à 82,2 par rapport aux autres types de lait, ce qui explique la densité selon laquelle la densité du lait de brebis est supérieure à la densité du lait de vache et de chèvre.

#### 5.2.2 Protéines

Les protéines du lait (caséines et protéines sériques) sont bien connues pour leur haute valeur nutritionnelle et leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles polyvalentes dans les produits alimentaires, ainsi que leur rôle dans la stabilité du lait (Bryant et McClements., 1998).

Les protéines sont totales du lait de brebis dont la valeur moyenne varie de 3.45 à 8.05% avec une valeur moyenne de 5.75 % (Azzouz, 2006).

Le lait de brebis entier est plus riche en protéines que les autres laits et contient environ 55.6g/l de matière azotée totale, la composition en acides aminés est excellente car il contient tous les acides aminés indispensables à l'organisme à proportion de 2.83g/l (Vignola et al., 2002).

**Tableau 20** :Teneur moyenne en g/L et distribution des protéines dans le lait de brebis (FAO, 1998).

Protéine	Brebis
$\alpha$ -lactalbumine	1,3 (10%)
$\beta$ -lactoglobuline	8,4 (67%)
Albumine sérique	0,6 (5%)
Immunoglobulines	2,3 (18%)
Protéase-peptone	0 (0%)
Total des protéines solubles (100%)	12,6 (100%)
Caséine $\alpha$ s	21,6 (47%)
Caséine $\beta$	16,1 (36%)
Caséine k	4,5 (10%)
Caséine $\gamma$	3,0 (6%)
Total des caséines (100%)	44,6 (100%)
Protides totaux	57,2 (5,72%)

### 5.2.3 Matière grasse

Le lait de brebis entier contient environ 70g/l de matières grasses. Composées à plus de 99% de lipides. La MG du lait de brebis contient de 48g/l d'AG saturés (en moyenne 69%) et(en moyenne 27%) pour les AG insaturés essentiellement sous 2 forme : 16g/l d'AG mono-insaturée et 3g/l sous forme poly-insaturée (Gilles lagriffoul et al., 2008). l'écémage du lait de brebis est très difficile du fait que ses globules gras ont une petite taille d'un diamètre de 1,99 nm et ils ont tendance à s'associer aux caséines (Talevski et al., 2009).

### 5.2.4 Vitamines

Le lait de brebis contient, en concentration relativement élevée, une grande variété de vitamines (Gérard,2001),Le lait et ses dérivés sont des sources notables en vitamine A B12

et B dans une moindre mesure en vitamine B1 B6 et PP . par contre, ils contiennent que peu de vitamines E, d'acide folique et de biotine (**Tableau 15**) (**Enjalbert,1993**).

**Tableau 21** : Teneur en vitamines de lait de Brebis mg/litre (**FAO, 2002**).

vitamines	Vache
B <sub>1</sub>	0.85
B <sub>2</sub>	3.30
B <sub>6</sub>	0.75
B <sub>12</sub>	0.006
Acide nicotinique	4.28
Acide folique	0.006
C	47.0
A	0.83
<i>B-carotène</i>	0.02

Le lait de brebis contient beaucoup de vitamine B12 que l'on trouve uniquement dans les produits d'origine animale et parfois dans des produits fermentés d'origine végétale. En général, le lait de brebis est plus riche en vitamines que le lait de vache.

### 5.2.6 Glucide

Dans le lait de brebis, les glucides sont représentés essentiellement par le lactose qui est synthétisé dans la glande mammaire. Il est considéré comme le troisième élément quantitativement important, son taux moyen se situe entre 45 et 50 g/Kg (**Luquet, 1985**).

### 5.2.7 Minéraux

Le lait de brebis est riche en sels minéraux une bonne source en calcium, en phosphore, en potassium, en iode, en zinc et en magnésium, en calcium en particulier. La composition minérale du lait de la vache est donnée dans le tableau 16.

**Tableau 22** : Teneur en élément de lait de vache (FAO, 2002).

Minéraux mg/litre	Calcium	Phosphore	Magnésium	Potassium	Sodium	Fer	Chlore
Brebis	1900	1500	160	1250	450	0.5à 0.7	1.21

### 5.2.8 Matière sèche et la matière sèche dégraissée

L'ensemble des composants du lait à l'exception de l'eau et du gaz dissous constitue la matière sèche totale. Un litre de lait de brebis en contient 125 à 130 g. la matière sèche dégraissée est la différence entre la matière sèche totale et la matière grasse (**Matieu,1998**).

**Chapitre II :**  
**Etude**  
**Expérimentale**

## 1. Objectifs

L'objectif principal de cette étude consiste principalement sur l'isolement, l'identification phénotypique et technologique de certaines souches des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache et de brebis de race locale des différents régions de Algérie et à rechercher d'éventuelles bactéries d'intérêt par les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries lactiques mésophiles à partir des laits fermentés.
- Identification phénotypique des isolats lactiques.
- Etude de quelques caractéristiques microbiologiques et biochimiques des souches lactiques isolées.
- La recherche de quelques aptitudes technologiques des isolats lactiques.

## 2. Lieu de travail

Ce travail est réalisé au niveau de laboratoires pédagogiques (1) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Abd Al-Hamid Ibn Badis Mostaganem, durant la période 21 Avril - 15 juin 2023.

## 3. provenance des échantillons

Dix échantillons de lait cru de vache et de brebis de race locale ont été collectés de deux fermes dans des différentes régions de Algérie pour réaliser cette étude (**Tableaux 23**), (**Figure 08**).

Les échantillons ont été prélevés aseptiquement à l'aide de traite manuelle (période de Mars à Mai) de manière aseptique dans des flacons stériles étiqueté (lieu, date de prélèvement, origine), transportés dans une glacière et acheminés au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.



**Figure 08 :** Echantillons de lait.

**Tableau 23 :** Provenance et l'origine des échantillons.

Nombre d'échantillons De départ	Code de la souche Après isolement	Nature du lait	Date de prélèvement	La région
01	LV1	Vache	27/04/2023	Tiaret
01	LV2	Vache	27/04/2023	Tiaret
01	LV4	Vache	27/04/2023	Tiaret
01	LB1	Brebis	28/04/2023	Tiaret

01	LB2	Brebis	28/04/2023	Tiaret
01	LD2	Vache	15/05/2023	Oran
01	L1	Vache	18/05/2023	Mascara
01	L4	Brebis	11/05/2023	Sidi Bel Abbés
01	LBB2	Brebis	10/05/2023	Oran (Misserghin)
01	L1B	Brebis	14/05/2023	Ain T'émouchent

#### 4. Les souches de références utilisées

Nous avons utilisé deux souches dont *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 2592 pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolées nous avons utilisées deux bactéries pathogènes (**Voir tableau 24**).

**Tableau 24** : Référence et origine de différentes souches pathogènes utilisées.

Souche	Gram	Référence	Origine
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 2592	Laboratoire de microbiologie, CHU Oran
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	

Les deux souches sont conservées sur gélose nutritive inclinée à +4°C. Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition, elles sont activées par transfert sur bouillon nutritif et incubées 24 h à 37 °C.

#### 5. Milieux de culture des souches

Les milieux de cultures utilisés dans notre travail, on a utilisé deux milieux pour l'isolement et l'identification des souches, milieux solides et milieux liquides :

L'isolement s'est fait sur deux milieux.

- Milieux MRS (De Man Rogosa et sharpe, référence : AEB 14065) et le pus connu pour la recherche et l'isolement des lactobacilles (**voir annexes 01**).
- Gélose nutritive (GN) pour la culture des souches pathogènes (**voir annexe 01**).
- Bouillon nutritif : utilisé pour la réactivation des souches pathogènes.

## 6. Isolement et purification des souches lactiques

Après la fermentation du lait, une série de dilutions est préparée dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique 0.85% (**Ashraf et shah, 2011**) (**voir annexe 01**).

- Prélever 1 ml de lait à l'aide d'une pipette graduée stérile.
- Introduire aseptiquement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ .
- Agiter puis transférer 1 ml de ce premier tube dans le deuxième et de la même façon effectuées les dilutions décimales successives (jusqu'à  $10^{-7}$ ).
- Les dilutions  $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$  ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant de la gélose MRS ajusté à pH 6.5 (**De Man et al., 1960**).

Les boîtes ont été incubées en anaérobiose pendant 48h-72 h à 37 °C (**Figure 09**).

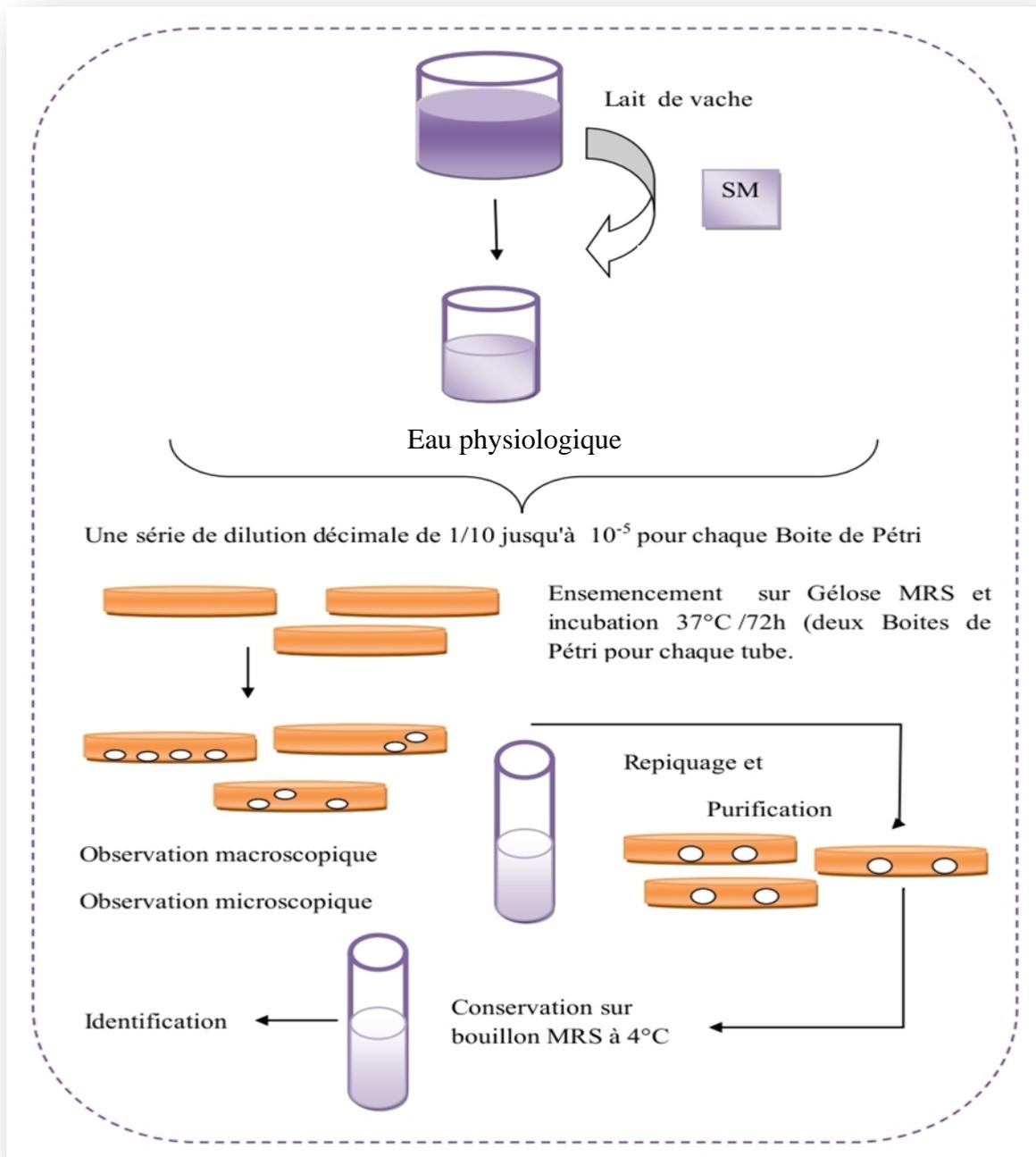


Figure 09 : Schéma illustratif des étapes de l'isolement.

## 7. Purification des souches

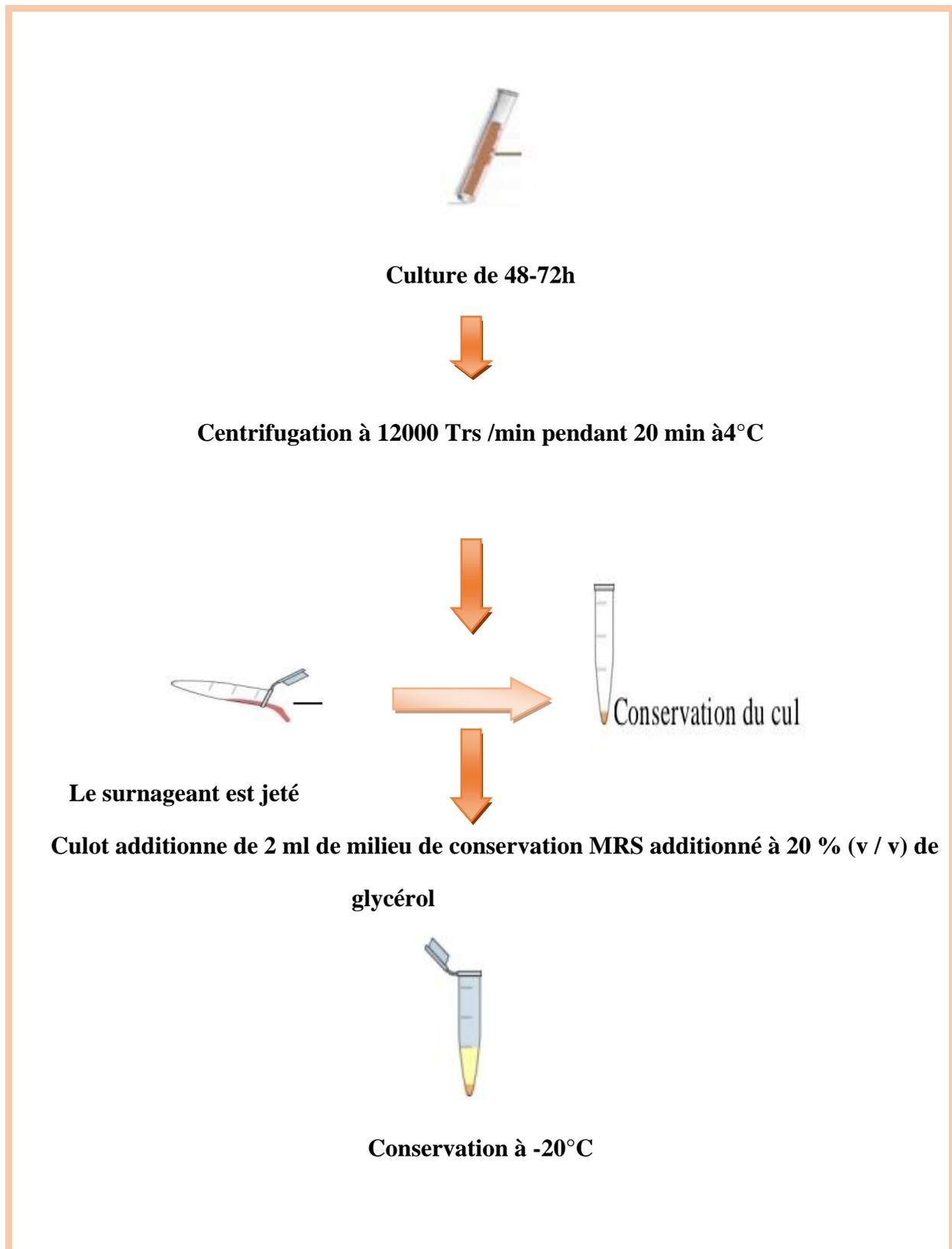
Afin de purifier les souches, un repiquage successif sont effectuées sur gélose (MRS) et bouillons (MRS). La purification des souches consiste à ensemencer en stries sur des boîtes Pétri contenant MRS les boîtes sont ainsi incubées à 37 C° pendant 24 h L'opération est répétée jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et homogènes de même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (souche pure).

La pureté des bactéries isolées est confirmée par un examen macroscopique et par examen microscopique après une coloration de Gram et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactique en bouillon (THAPA *et al.*, 2006).

## 8. Conservation des souches bactériennes

### ▪ Conservation à long terme

A partir des cultures jeunes de (48-72 h), préalablement purifiées sur milieu liquide, les cellules ont été 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. Le milieu de conservation contient un bouillon MRS additionné à 20 % (v / v) de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense dans des tubes d'ependorfs à -20°C (Font de Valdez, 2002) (Figure 10).



**Figure 10:** Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées a refaire il faut ajouter à 4°C ( *Badis et al., 2005*).

## 9. Caractéristiques phénotypiques des souches de lactobacilles

L'identification phénotypique des souches de lactobacilles est réalisée par l'étude macroscopique et microscopique.

### 9.1. Etude morphologique

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

#### 9.1.1. Examen macroscopique

La détermination des caractères macroscopique se fait à l'œil nue, permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation, afin de déterminer la taille, la couleur, la forme, pigmentation, l'aspect et le contour des colonies.

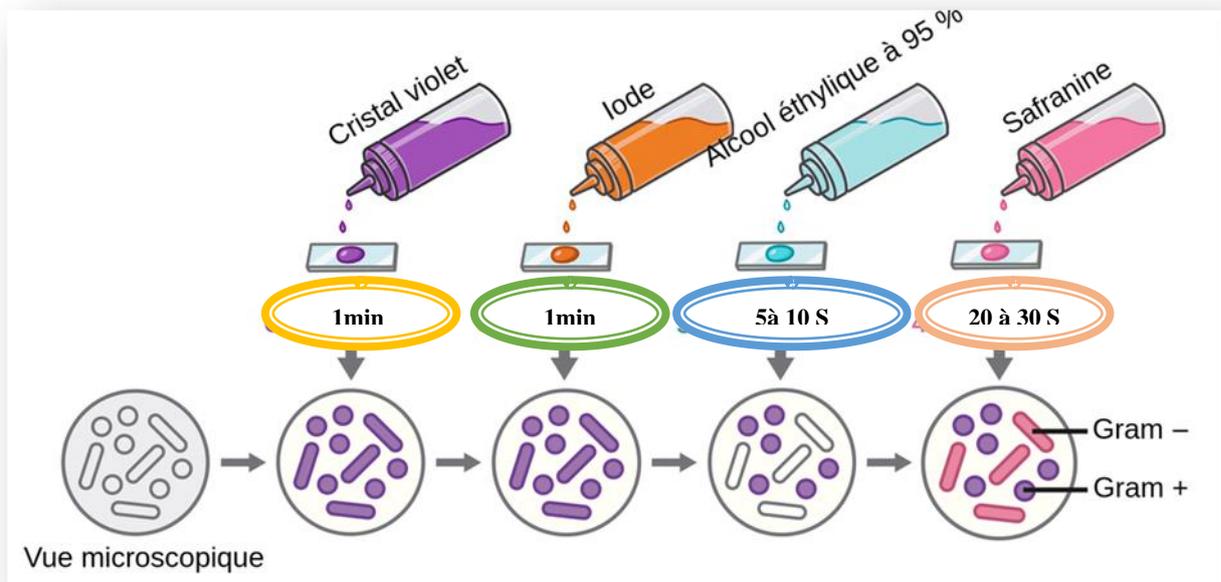
#### 9.1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement (**Gx1000**) permettra de classer les bactéries selon leur Gram et d'observer leur morphologie cellulaire et leur mode d'association. Ce test est effectué sur des frottis auparavant colorés par une coloration de Gram (**Joffin et Lyrat., 1996**).

#### 9.1.3. Les étapes de coloration de Gram

La coloration de Gram consiste a déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixe pendant 1 minute, après rinçage, On redépose du Lugol pendant 1 minute, les bactéries sont décolorées à l'alcool 95° puis on rince avec de l'eau distille .Enfin ,quelques goutte de fuschine sont versées sur la lame qu'on laisse agir 20 à 30 seconde . La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique avec le huile d'immersion (**Larpent et al.,1990**) (**Figure 11** ).

Les bactéries lactique sont des bactéries à Gram positif apparaissent en violet .



**Figure 11 :** Les différentes étapes de coloration de Gram.

## 10. Critères physiologique et biochimique

### A. Test de la catalase

La catalase est une enzyme permet la dégradation de peroxydase d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.

Le test s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence de l'eau oxygénée sur une lame. Le dégagement de bulles de gaz témoigne la présence de la catalase (**BRAHIMI, 2015**). Les bactéries lactiques étant catalase négatif.

La réaction chimique de dégradation d'eau oxygénée s'établit comme suit:



### B. Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries mésophiles des bactéries thermophiles. Les bactéries ont étéensemencées et incubées en milieux MRS bouillon à deux températures  $37^\circ C$  et  $45^\circ C$ , pendant 48h-72h. La croissance bactérienne est appréciée par

l'apparition de trouble en milieu MRS après 24 h à 48 h d'incubation à 37°C et 45°C (Chrifi, 2019).

### C. Croissance en Concentration 6.5 % NaCl

Les colonies à tester sontensemencées sur des bouillons hyper sales à 6.5 % NaCl et sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La croissance aux différentes concentrations se traduit par un trouble.

### D. Croissance en milieu hyperalcalin pH 9.6

Une colonie de culture jeune de chaque souche estensemencée dans 10 ml de milieu MRS ajusté à pH 9,6 puis incubée à 37°C pendant (48-72h). La croissance des bactéries est appréciées par l'apparition d'un trouble dans les tubes.

## Etude de quelques Aptitudes technologiques des bactéries Lactiques

### 11. Caractérisation technologique des souches

#### 11.1. Activité antibactérienne des souches de lactobacilles

Les différentes souches lactobacilles ont été testées pour la production d'un composé antimicrobien contre des bactéries pathogènes

Les souches indicatrices, *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 2592" ont 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 a 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 (Rubio *et al.*, 2014).

## 11.2. Activité protéolytique des souches de lactobacilles

L'activité protéolytique des différentes espèces de bactéries est cherchée sur milieu YMA (Yeast Milk Agar).

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées sur milieu MRS bouillon et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Des disques stériles ont été ensemencés 10 µl de chaque suspension que l'on dépose à la surface des boîtes de pétri contenant du milieu YMA. On laisse les boîtes 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 (-, +, ++) (**Christensen et al., 1999**).

## 11.3. Pouvoir aromatisant

La production d'acétoïne (*acétyl méthyl carbinol*) est testée 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 de V.P (**Avril et al., 1992**).

Dans un tube à hémolyse, 2 ml de cette culture sont transvasés. 0.5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP1) et 0.5 ml de réactif alpha-naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP2). On agite soigneusement les tubes et 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. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylène glycolique (**Zourari et al., 1992 et Guessas, 2006**).

## 11.4. Production des exopolysaccharides (EPS)

### ➤ Sur milieu hypersaccharosé

La production des EPS a été testée sur milieu hypersaccharosé avec un pH ajusté à 7 (voir annexe). Les souches à tester ont été ensemencées 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**).

➤ **Sur milieu a base de rouge de ruthénium**

Les souches à tester ont étéensemencées en stries sur milieu gélosé a base de rouge de rouge de ruthénium les souches productrices des EPS donne des colonies blanches (**Gordona R . Dimié , 2006**).

**Chapitre III :**

**Résultats**

**Et**

**Discussion**

### 1. Isolement et purification des souches lactique

Au cours de notre étude, on a ciblé l'isolement de dix *Lactobacillus* mésophiles à partir de deux types de lait fermenté vache et brebis. Les bactéries à Gram positif et catalase négative sont sélectionnées lors de cette étude.

La purification des souches lactiques isolées a été réalisée par plusieurs repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS. Cela a permis d'obtenir des souches pures. Les souches purifiées sont désignées par un code constitué de deux lettres et d'un chiffre (**Tableau 25**). Tandis que les caractères biochimiques et physiologiques des isolats des souches lactiques sont rapportés dans le tableau 27.

**Tableau 25** : Les codes des souches lactiques isolées.

Milieu d'isolement	Code des souches isolées
MRS	LV1
	LV2
	LV4
	LB2
	LD2
	L1B
	LBB2
	L1BB
	L1
	L4

**Tableau 26** : résultats de l'identification phénotypique et biochimique des isolats de lactobacilles

Souche / Test	LV2	LV4	LV1	LD2	LB2	L1B	LBB2	L1	L4
<b>Forme cellulaire</b>	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à Température 37°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Croissance à Température 45°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance De NaCl à 6.5%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance De pH 9.6%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Genre</b>	<i>Lactobacillus</i>								

(-): Test négatif.(+): Test positif.

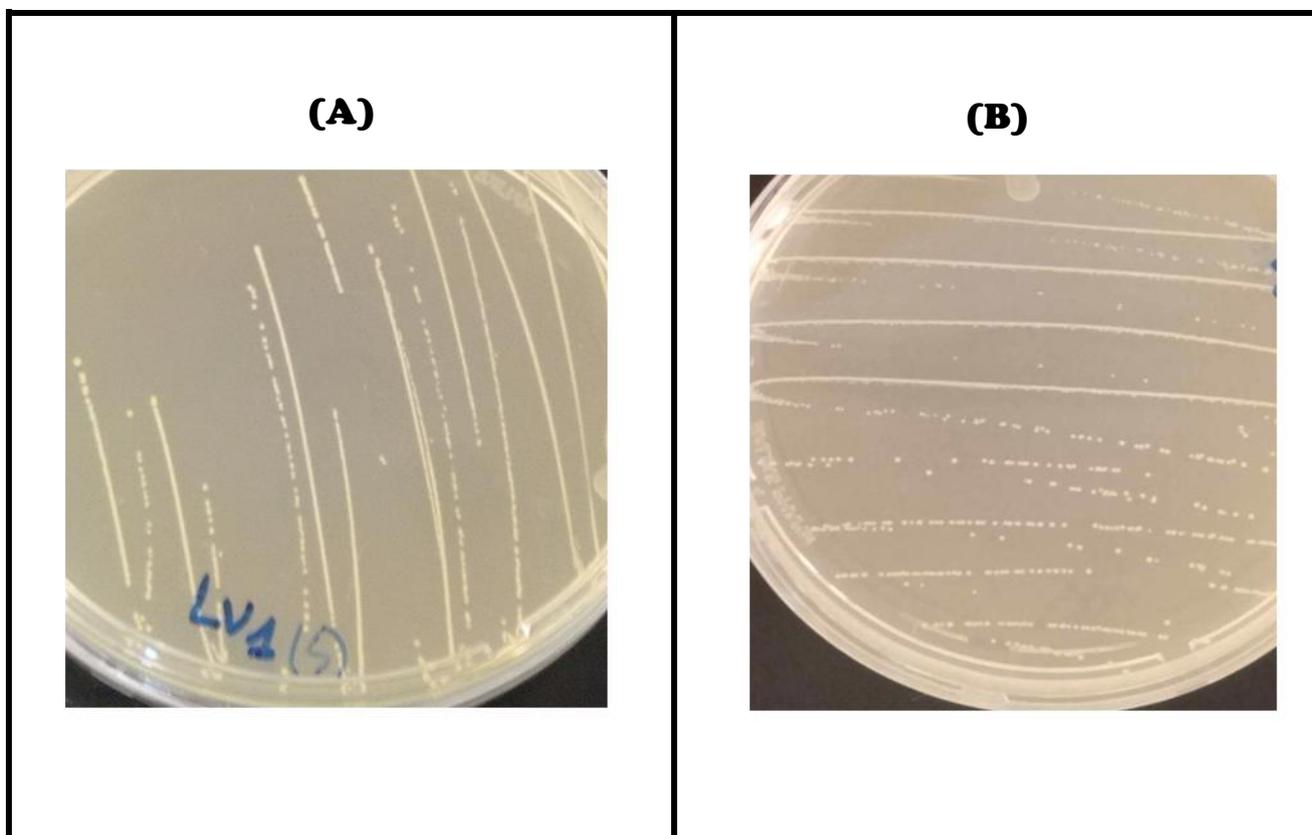
## 2. Identification phénotypiques des souches de lactobacilles

### 2.1. Examen macroscopique

#### A) Sur milieu MRS solide

L'observation directe des colonies sur gélose MRS permet de déterminer les caractéristiques macroscopiques des bactéries.

Les colonies de Lactobacilles mésophiles développées sur milieu MRS solide sont moyennes avec un pourtour irrégulier (**Figure 12**).



**Figure 12** : Aspect macroscopique des colonies de lactobacilles de la souche LV1 et la souche LB2.

#### B) sur milieu liquide

La croissance des bactéries lactique apparait sous forme d'un trouble homogène (**Carr et al., 2002**) sur milieu MRS liquide (**Figure 13**) .

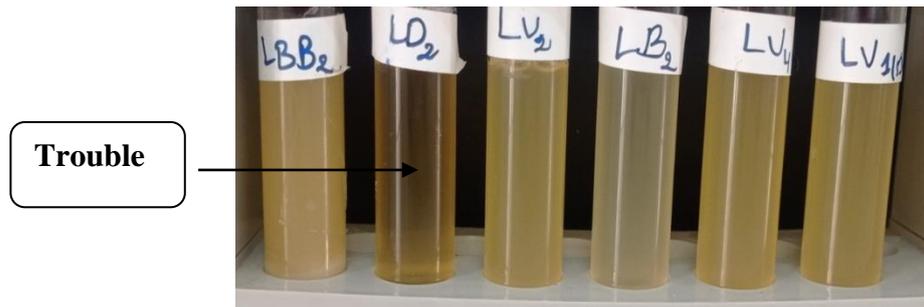
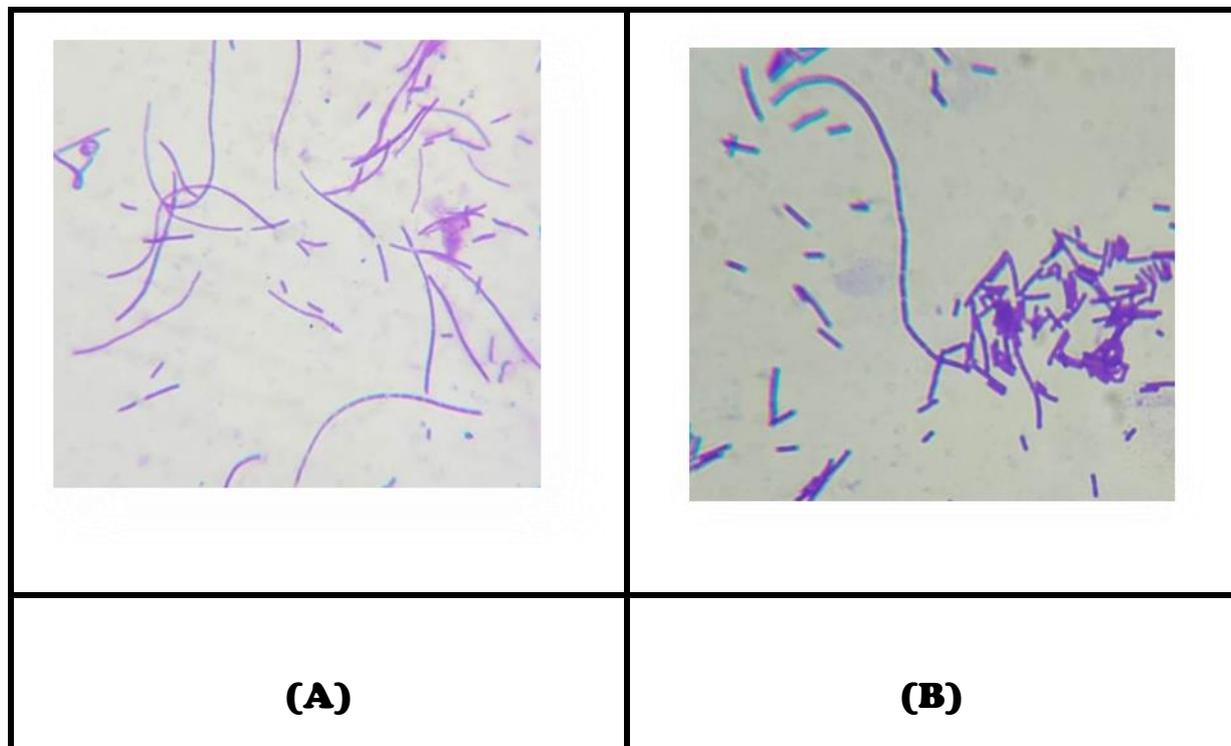
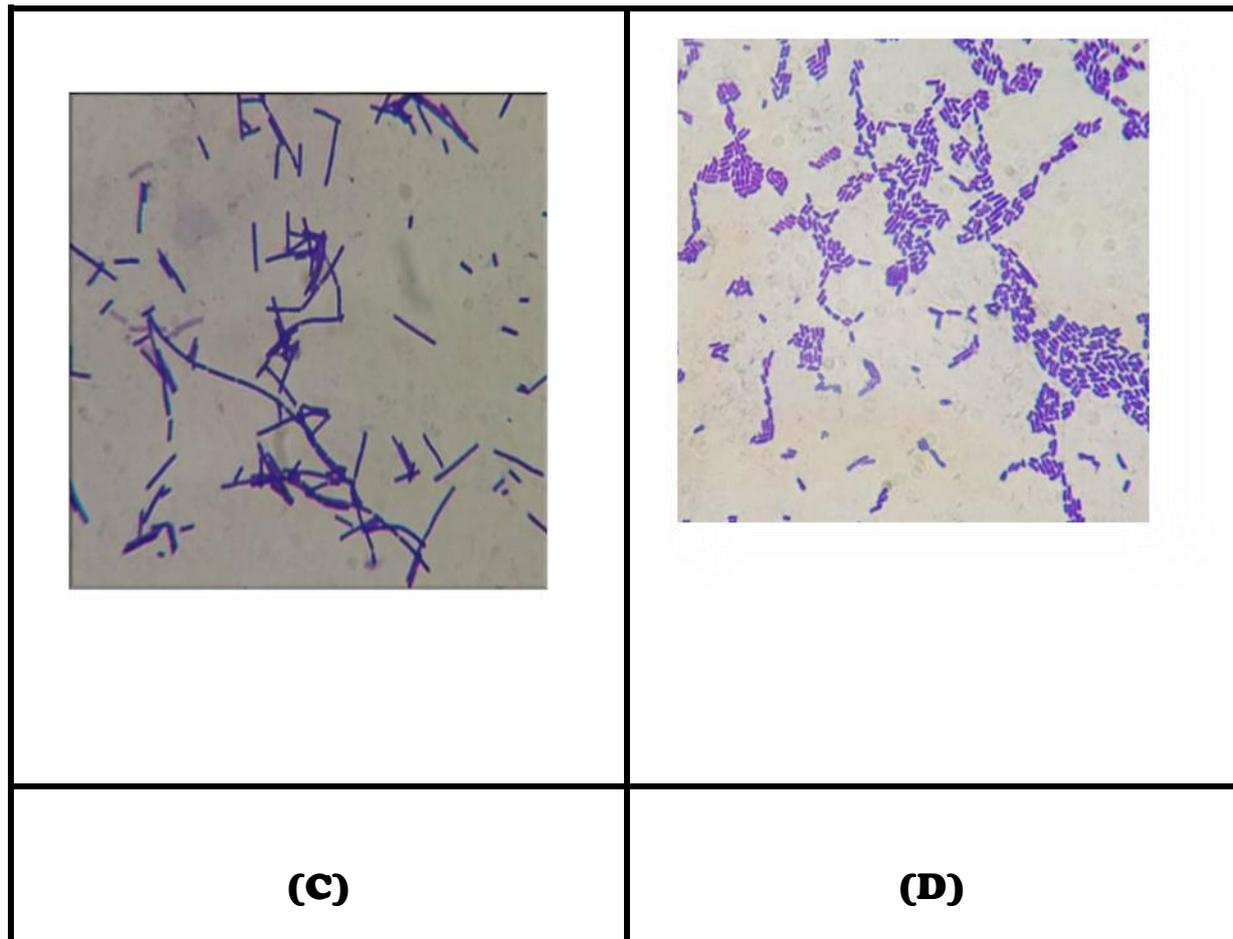


Figure 13 : Aspect des souches pures sur bouillon MRS.

### 2.2. Etude microscopique

L'observation microscopique de souches de lactobacilles mésophiles après coloration de Gram révèle la présence de cellules très allongées avec présence de segments (Figure 14).





**Figure 14:** Aspect microscopique des souches *Lactobacillus* ( $G \times 100$ )

( A: LV1, B: LD2, C: L1BB, D: LBB2 ).

### 3. Observation macroscopique et microscopique des souches indicatrices utilisées dans cette étude



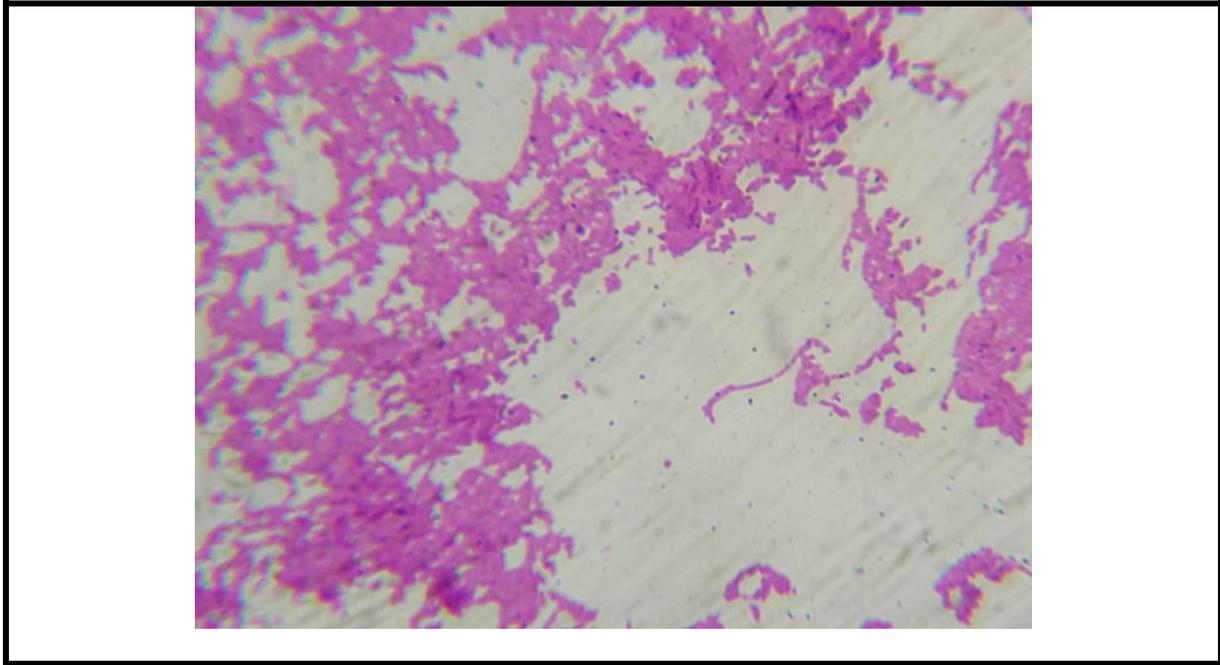
**Figure 15 :** Culture des bactéries pathogène *E. coli* 2592 et *S. aureus* 25923 sur gélose GN.

#### 4. Description microscopique des souches indicatrice

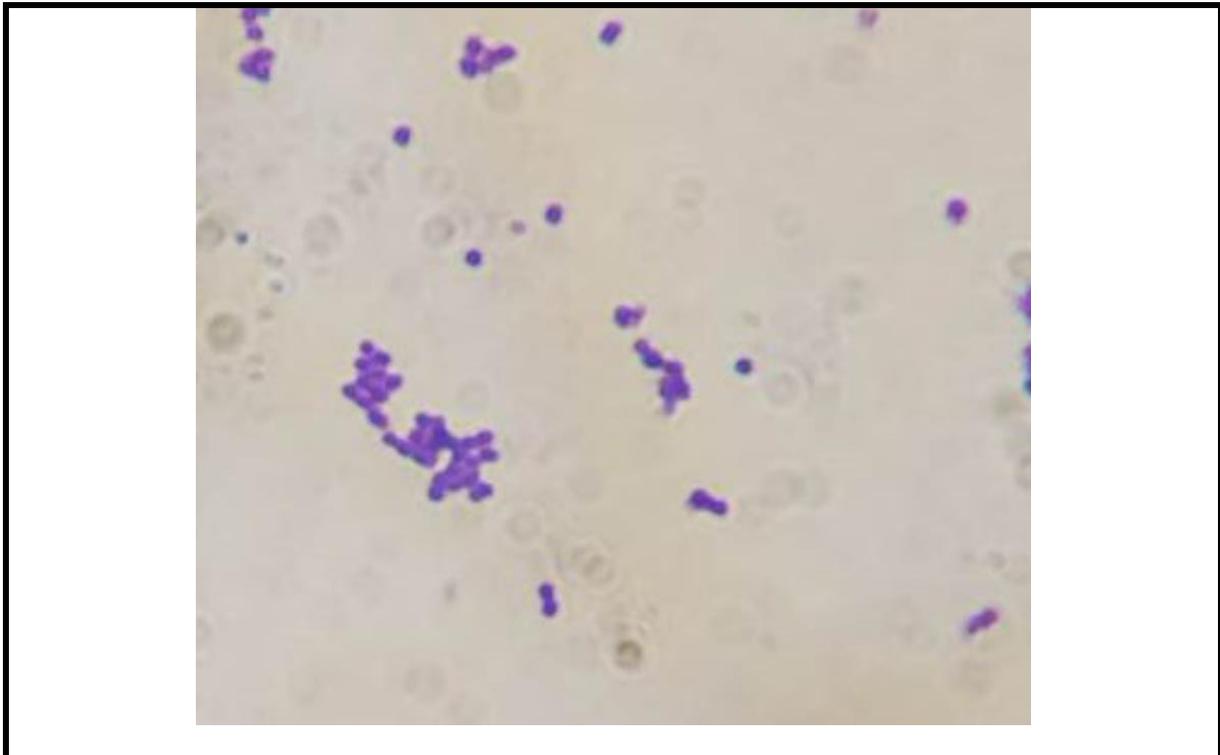
Les résultats de l'observation microscopique de la souche *Escherichia coli* ATCC 2592 et de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après coloration de Gram sont exprimés dans la **figure 16, 17, Tableau 27**.

**Tableau 27 :** Observation microscopique des deux souches *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après coloration de Gram.

Souche pathogène	Gram	Observation microscopique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	Gram négatif	Bacilles courts colorés en roses
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram positif	Coques en chainettes et en amas colorés en violet



**Figure 16 :** Observation microscopique de *Escherichia coli* après coloration de Gram (**G × 100**) .



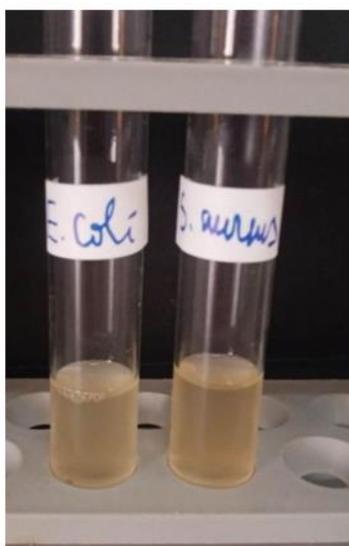
**Figure 17 :** Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* bactéries pathogènes Gram (**G × 100**)

## 5. Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats de lactobacilles

### 5.1. Activité antibactérienne

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 18**).



**Figure 18** : Culture des bactéries pathogène *E. coli* et *S.aureus* dans le bouillon GN.

Toutes les souches de *Lactobacillus* ont montré une activité inhibitrice contre les deux souches indicatrices *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 à l'exception la souche (C ; LD2) n'as pas montré un halo d'inhibition contre les deux souches indicatrices. Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés dans le **Tableau 28** et **Figure 19, 20, 21, 22**.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire autour des souches de lactobacilles testés qu'est considérée comme inhibition positive. Les résultats des zones d'inhibitions représentées dans les photos et tableau ci-dessus :



**Figure 19 :** Résultats de l'activité antibactérienne des de lactobacilles vis a vis souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A) La souche : LV1, B) La souche : LBB2, C) La souche : LD2



**Figure 20 :** Résultat de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D) La souche :LB2, E) La souche : LV4, F) La souche : LV2



**Figure 21 :** Résultat de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis

*Escherichia coli* ATCC 2592.

A) la souche : LV1, B) la souche : LBB2, C) la souche : LD2



**Figure 22 :** Résultat de l'activité antibactérienne des souches de lactobacilles vis a vis

*Escherichia coli* ATCC 2592.

D) la souche : LB2, E) la souche : LV4, F) la souche : LV2

**Tableau 28** : Activité antibactérienne des souches des bactéries lactique vis à vis *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Les isolats tests (ayant une activité antibactérienne)						
Souche pathogène	LV1	LV2	LV4	LD2	LB2	LBB2
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	+	+

**(+)**: présence du zone d'inhibition.

**(-)** : absence du zone d'inhibition.

Les souches LV1, LBB2, LB2, LV4, LV2 produisent des substances antimicrobiennes contre *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De nombreuses études ont confirmé que les souches de *Lactobacillus* ont des propriétés antibactériennes contre les bactéries a Gram négatif comme (*E. coli*) et positif comme (*S. aureus*) telles que trouvées par (Labtar *et al.*, 2019 ; Ammor *et al.*, 2005 ).

Ces résultats indiquent que les neufs souches de lactobacilles sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

## 5.2. Activité protéolytique

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 se manifeste par l'apparition de zone claire de protéolyse autour des lactobacilles. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 29 et Figure 23.

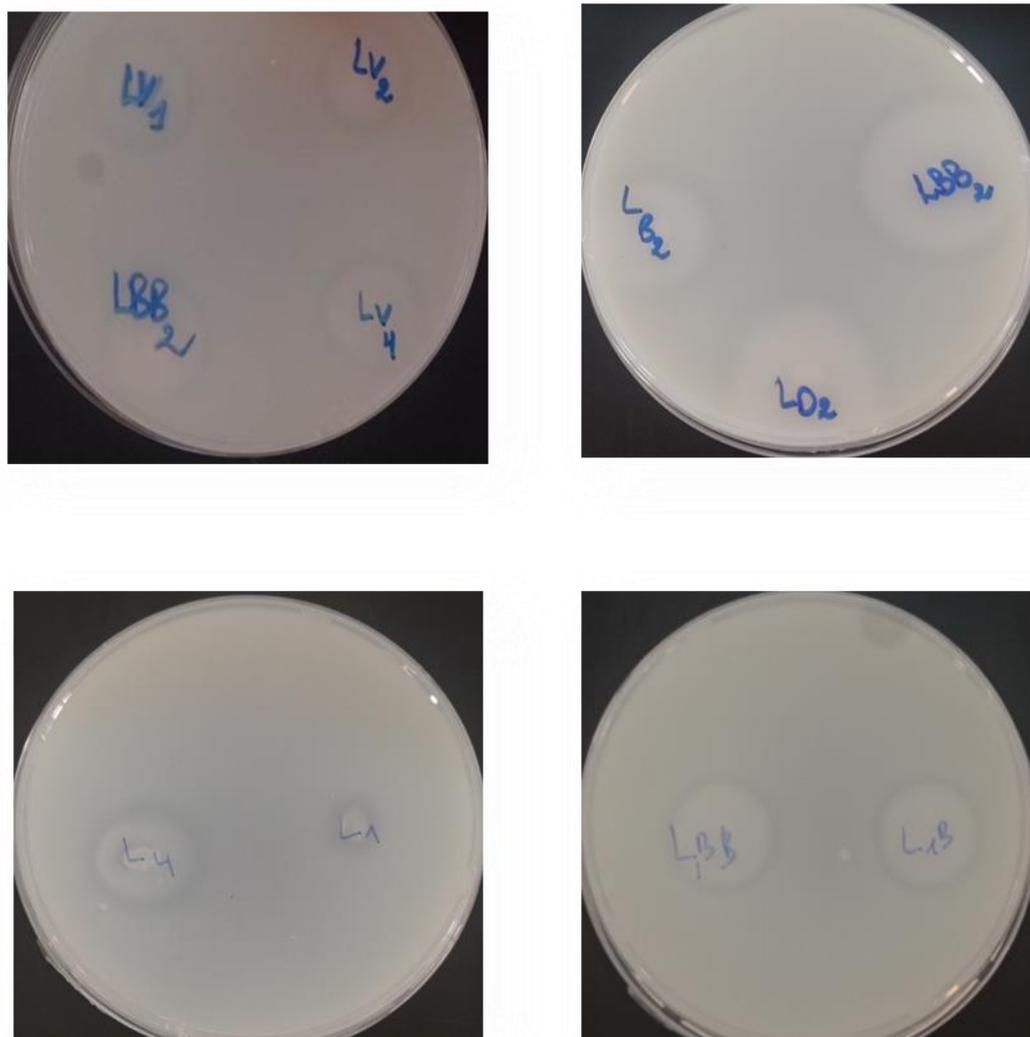
Toutes les souches de lactobacilles étudiées ont montré une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair les diamètres des halos varie entre 2 et 8 mm de diamètre.

**Tableau 29** : Valeurs moyennes du diamètre de la zone de protéolyse Souches lactiques.

Les souches	Activité protéolytiques	Diamètre de zones de protéolyse (mm)
LV1	+	5
LV2	+	3
LV4	+	4,5
LB2	+	3
LD2	+	3
LBB2	+	8
L1	+	2
L4	+	3
L1B	+	7
L1BB	+	6

La souche LBB2 a montré un halo d'hydrolyse de diamètre le plus large (8 mm) tandis que la souche LB2 et LV2, L4 ont montré le même diamètre d'halo clair (3mm), LV1, LV4, L1B, ont montré des diamètres des halos qui ont été respectivement (5, 4,5, 7mm) LD2, L1BB.

La souche L1 a montré un halo d'hydrolyse de diamètre le plus faible (2 mm) comparativement aux autres souches.



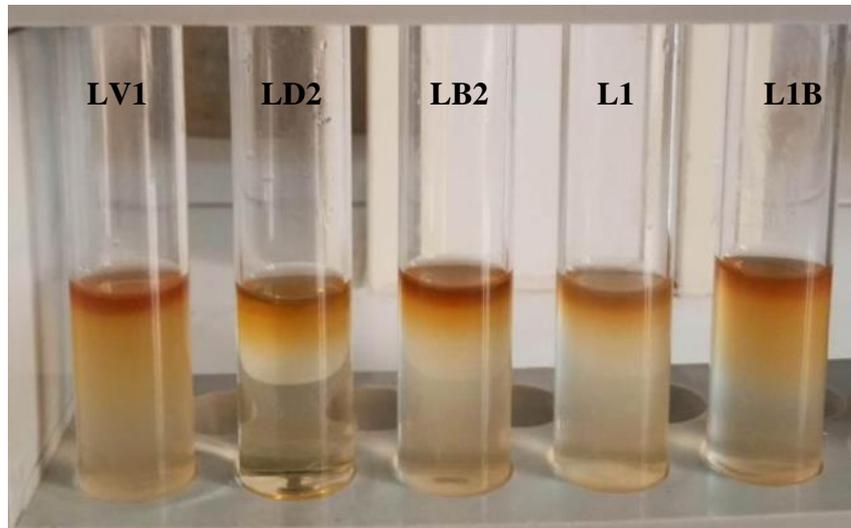
**Figure 23** : L'activité protéolytique des souches de lactobacillus.

Des résultats similaires sur l'activité protéolytiques des lactobacilles ont été obtenues par **Shirai et al., (2001)** et de **Francois et al., (2007)**.

### 5.3 Pouvoir aromatisant

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (**Raynaud et al., 2003 ; Cholet, 2006**). L'acétoïne est l'un des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique (**Hadef, 2012**).

Les résultats obtenus après la réalisation de ce test dans bouillon clark et lubs sont groupés dans la figure 16, il apparaît que les souches (LV1, LD2, LB2, L1, L1B) ont un pouvoir aromatique car ils présentent un anneau rouge autour du tube après l'ajout de 2 réactifs (VP1, VP2).



**Figure 24 :** Production d'arome par les bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers (Raynaud et al., 2003).

## 5.4 Production des exopolysaccharides (EPS)

### 5.4.1. Sur milieu hypersaccharosé

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *Lactobacillus* produisent des exopolysaccharides (EPS) sur milieu MRS hypersaccharosé, par la formation de colonies larges, gluantes et visqueuses **Figure 25 et Tableau 30**.

La production des exopolysaccharides (EPS) sur milieu gélosé à base de saccharose, les souches (LV1, LD2, LB2, L1, L4, LBB2, L1B, L1BB) a été sélectionnées comme productrices d'exopolysaccharides (EPS) dans le milieu hyper saccharose .

Tableau 30 : Production d'exo polysaccharides par les bactéries lactique.

Les souches	Milieu Lait et Rouge de ruthénium	Milieu hyper saccharose
LV1	+	+
LD2	+	+
LB2	+	+
LBB2	+	+
L1	+	+
L4	+	+
L1B	+	+
L1BB	+	+

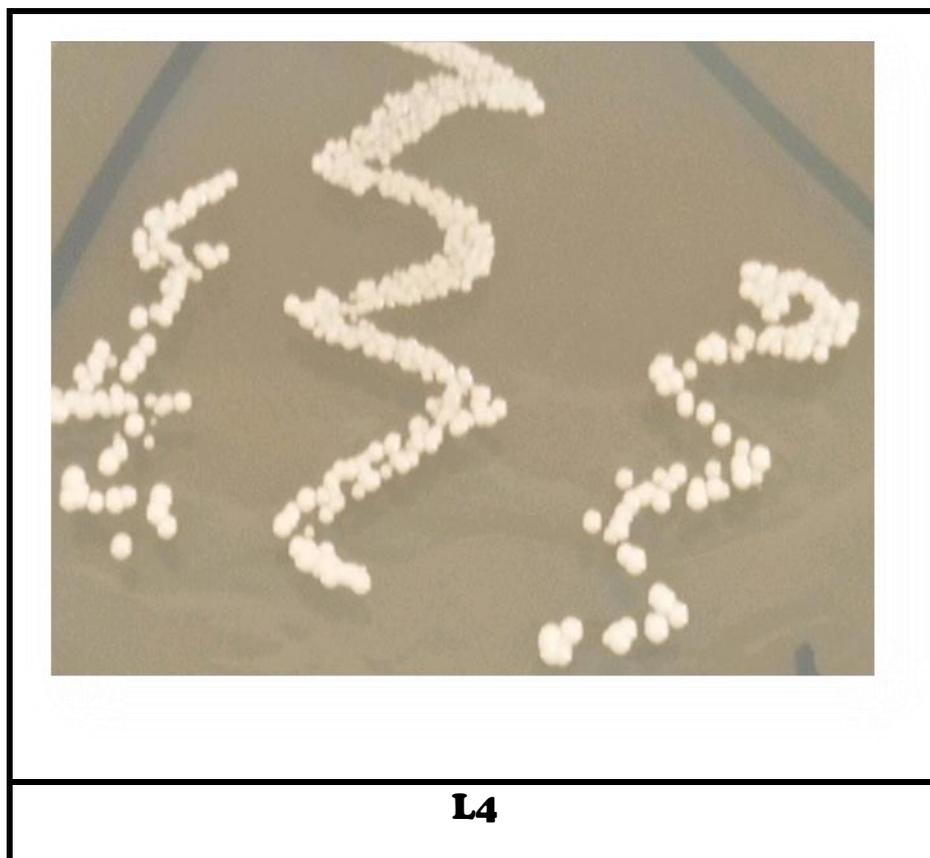


Figure 25 : production des EPS par L4 milieu hypèrsaccharosé 10%)

#### 5.4.2. Sur milieu lait à base de ruthénium

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *Lactobacillus* produisent des exopolysaccharides (EPS) sur milieu lait à base de ruthénium, par la formation de colonies de colonies blanches larges, gluantes et très visqueuses, les résultats sont montrés dans la **Figure 26** .

Des résultats similaires ont été rapportés par (Leveau et Bouix. ; 1993)



**Figure 26** : Aspect macroscopique des colonies des souches isolées sur milieu lait et Rouge de ruthénium.



# **Conclusion**

## Conclusion

---

### Conclusion

Dans cette étude nous avons isolés 10 souches de *Lactobacillus* a partir des échantillons de lait de vache et de brebis.

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* retenues ont été identifiées par des tests physico-chimiques et microbiologiques.

Nous avons cherché des propriétés organoleptiques qui sont en priorité lors de la sélection des souches d'intérêt technologique tels que, l'activité protéolytique, production de l'acétoïne, production des exopolysaccharides (EPS).

D'une part les résultats suggèrent que la majorité des souches de *Lactobacillus* isolés possèdent une activité protéolytique, et ont un pouvoir inhibiteur contre l'agent pathogène *E. coli* ATCC2592, *S. aureus* ATCC25923.

Enfin ,et en perspectives , que ce modeste travail donne libre voie pour des études plus approfondies afin de mieux utiliser les bactéries lactiques a des fins thérapeutiques , industrielles , cosmétiques , et agroalimentaires.

# **Références**

# **Bibliographies**

## Références bibliographiques

---

Ababsa A, 2012 recherche de bactériocines par les bactéries lactique du lait ,mémoire de magister setif : Université FERHAT SETIF.

ABOUTAYEB, R. (2009). Technologie du lait et dérivés laitiers. <http://www.azaquar.com>.

Adams M R., Hall C J., 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*. 23 (3): 287-292.

Adrian. J, 1987. Les vitamines, le lait matière première de l'industrie laitière, 2 volume2, première édition, p26

Adrian. J, 1987. Les vitamines, le lait matière première de l'industrie laitière, 2 volume2, première édition, p26

Alais C., 1984. Sciences du lait: principes et techniques laitiers. 4ème édition.- Paris: Edition S Alias. (1984). Sciences du lait, principes des techniques laitiers. Edition SEPAIC. Paris. pp: 441-432 EPAIC.-814 p.

ALVES, L. (2006). Site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, [en ligne] Adresse URL:<http://www.vetlyon.fr/ens/nut/webbromato/cours/cmlait/cmsomlai.html>.  
Amiot J, Fourniers,

Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R et Turgeon H. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait In VIGNOLA C.L. Science et technologie du lait - Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, 600 p.

VIGNOLA, C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses intl polytechnique, quebec. 600.

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., ... &Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22(5), 373-382.

Apfelbaum, M., Roman, M. (2004). Diététique et nutrition, Edi Vuibert.168.

## Références bibliographiques

---

Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review. *International journal of food microbiology*, 149(3), 194-208.

Atlan, D., Béal, C., Champomier-Vergès, M.-C., Chapot-Chartier, M.-P., Chouayekh, H., Coccagn-Bousquet, M., Deghorain, M., et al. (2008) Métabolisme et Ingénierie Métabolique. In: Corrieu, G., Luquet, F.-M., Eds., Bactéries lactiques, de la Génétique aux Ferments, Vol. 2008, Tec&Doc, Paris, 271-449.

Avril D, et Denis M .1992.Biopreservation by lactic acid bacteria .Antonie leeuwenhoek .J.70:331-345.

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

Avril, M. F., Charpentier, P., Margulis, A., & Guillaume, J. C. (1992). Regression of primary melanoma with metastases. *Cancer*, 69(6), 1377-1381.

Axelsson L, 2004. Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. etOuwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. NewYork. 1-66.

Badis A.,laouabdia-Selami N., Geutarni D., Kihal M et Ouzrout R., 2006.Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations caprines locales“Arabia et kabyle”.Sci ettechnol. 23 :30-37.

Bahri, F. (2014). Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants, thèse de doctorat. Université Constantine I Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, 147p.

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.

Belyagoubi, L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens, thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd- Tlemcen,Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, 209p.

## Références bibliographies

---

- Berthier F, Dusko Ehrlich S (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region FEMS. Microbiol. Letters, 161: 97-106.
- Bitman J, Wood D, Miller et al, 1996. Comparaison of milk and blood lipids in jersey and holstein - cows fed total mixed rations with or without whole cottonseed. J. DairySci.
- Blanc B .1982. Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. Le Lait, INRA Editions, 62 (617\_618\_619\_620), pp.350-395.
- Boudersa, W & Nekkaa, R. (2017). Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé, Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 84p.
- Bouguerra, A. (2021). Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, 15, 16, 51 et 141.p.
- Boumediene K., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire de Magister en Biologie. Faculté des SNV/STU. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. 04p .
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. Trends in Food Science and Technology, 9(4), 143–151.
- Butel, M.J. (2014) Probiotics, Gut Microbiota and Health. Médecine et maladies infectieuses, 44, 1-8.
- Bylund G, 1995. Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems AB S-221 86, Lund, Sweden. 436 pages
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. (1999) Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131-149.
- Carr, J. E., & Sidener, T. M. (2002). On the relation between applied behavior analysis and positive behavioral support. *The Behavior Analyst*, 25, 245-253.
- Cayot P, Lorient D, 1998. Structures et techno fonctions des protéines du lait. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- Chemlal-Kheraz, D. (2013). Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des science département de biologie, 217p.
- Chettah .f.z ., 2019 Evaluation de la qualité mycologique et nutritionnelle du lait cru de chamelle dans la région de Biskra.. Mémoire de master. universite mohamed khlider

## Références bibliographiques

---

de biskra.

CHILLIARD Y. et LAMBERET G. (1984). La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variation, signification pratique. *Le Lait*, 64, 544-578.

Chilliard. Y, (1997). Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre : Comparaison avec les laits de vache et humain. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 59, 1, 51

Cholet, O. (2006). *Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire* (Doctoral dissertation, INAPG (AgroParisTech)).

Christensen, J. E., Pederson, J. A., Steele, J. L., & Dudley, E. G. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands (pp. 217-246). Springer Netherlands.

Cienkowski, L. (1878) Untersuchung fiber die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes [Russian Summary]. *Arbeit Naturforsch. Gesellsch. Univ. Charkoff*. p. 12.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., BianchiSalvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64, 409-421

Corroler, D., Desmasures, N., Guéguen, M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 91-99.

Court et Leymarios, F. 2010. Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras: voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse de Doctorat vétérinaire, Créteil, 2010.128 p.

COURTET LEYAMARIOS, F., 2010. qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Thèse pour le doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 122p

Crayot P, Lorient D, 1998. Structures et tecno fonctions des protéines du lait. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.

Dahlborn K., Hossaini-Hilali J., Benlamlh S., 1997. Changes in fluid balance, milk osmolality and water content during dehydration and rehydration in two lactating camels (*Camelus dromedarius*). *J. C. P.R.* 4, 207-211. Dahshan, A., & Rabah, R. (2000). Correlation of endoscopy and histology in the gastroesophageal mucosa in children: are routine biopsies justified?. *Journal of clinical gastroenterology*, 31(3), 213-216.

## Références bibliographiques

---

De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130-135.

De Vuyst L., Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M C., Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques Loriga, uriage. 1(1) : 25-116.

DEBRY G., (2001). Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 21 (566 pages).

Deghorain, M., et al. (2008) Métabolisme et Ingénierie Métabolique. In:Corrieu, G., Luquet, F.-M., Eds., Bactéries lactiques, de la Génétique aux Ferments, Vol. 2008, Tec&Doc, Paris, 271-449 .

DESJEUX JF. (1993). Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait*, 73, 573-

DESMAZEAUD M.J., 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*. 63, 267-316.

Devoyod, J.J., Poullain, F., 1988. Les leuconostocs: propriétés, leur rôle en technologie laitière. *Lait* 68, 249–280.

Dimić, G. R. (2006). Characteristics of the *Leuconostocmesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. *Acta periodicatechnologica*, (37), 3-11..

Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (1), 143-154.

DriderDj ., Prevost H. (2009). Bactéries lactiques : Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, édition ECONOMICA, France, p1, 35, 36, 51, 53, 99

El-Hatmi, H., Girardet, J.-M., Gaillard, J.-L., Yahyaoui, M. H., & Attia, H. (2007). Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. *Small Ruminant Research*, \*

## Références bibliographies

---

ENJALBERT, F. (1993). Alimentation et composition du lait de vache. point vet, 25 (156) : 769-778.

Ennuyer M., Laumonier G., (2013) VADE-MECUM de gestion de l'élevage bovin laitier Edition MED'COM, Paris, 478p.

FAO, (2002). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 5: laits fermentés. Collection FAO / Alimentation et Nutrition, 28, 7p.

FAO. (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28. Bibliothèque David Lubin. FAO. Rome Italie.

FARAH Z., ABDULKADIR O., ABDURAHMAN S.H, 2004- Milk and meat from the camel: handbook on products and processing. VdfHochschulverlag AG an der ETH Zurich, Zurich/ Singen.

FAVIER J.C., (1985). Composition du lait de vache-Laits de consommation

FREDOT E., (2006). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages).

GAUCHERON F., (2004). Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages). 27. GAUCHERON F., (2004). Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages).

Ghaoues S. (2011). Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister. Constantine

Ghaoues S., 2011. Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'Est Algérien. Mémoire du Magister en sciences alimentaires. I.N.A.T.A.A. Université Mentouri. Constantine. 130 pages.

Gilles lagriffoul., Yves chilliard., Edmon Rock., Yvette Soustre., Marie Verdaguer., Cécile Bailly., Fabienne Millet., Isabelle Masle. & Jean Marc Pinelli. (2008). Composition fine du lait et des fromages de brebis. Septembre 2008.

Guessas, B., Hadadji, M., Saidi, N., & Kihal, M. (2007). Inhibition of Staphylococcus aureus growth by lactic acid bacteria in milk. In African Crop Science Conference Proceedings (Vol. 8, pp. 1159-1163).

Guiraud et Galzy, 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Edition : L'usine nouvelle, Paris, 239p.

## Références bibliographiques

---

Hadef, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales, thèse de magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers Département des Sciences de la Nature et de la Vie, 135p.

HAMMI, I. (2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français, thèse de doctorat.

Hassaine O, 2013. Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien .Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'oran.

Hoden A., Coulon J.B., 1991. Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la qualité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Prod. Anim., 4, 361-367.

Hoden A., Coulon J.-B., 1991. Maîtrise de la composition du lait. – Influence des facteurs

Holzappel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley and Sons. Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 365s-373s.

JEAN C., et DIJON C., (1993) Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.

Jean-Christophe Vuilleumard, science et technologie du lait, (3), 2018, page 6 ; 8 ; 9.

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P. et BRULE G., (2007). Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 17 (456 pages).

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P., BRULE G. 2008. Science des aliments: tome 2, technologie des produits alimentaires. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, p. 58-59.

Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M. E., Huang, D. Q., & Diviès, C. (1996). Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. Letters in applied microbiology, 22(3), 219-223.

König H. and Fröhlich J.(2009). Lactic Acid Bacteria, Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. • König, H. et Fröhlich, J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.

## Références bibliographiques

---

Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.

Labtar, A., Larouci, S., Guermouche, A., & Bensalah, F. (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 Journal of Experimental Biology*, 9(3).

Larpent, J.-P., & Larpent-Gourgaud, M. (1985). *Eléments de Microbiologie*. Hermann.

Le beuf, Y., Michel, J.C. & Moineau, S. (2002). Propriétés physico chimiques, valeur nutrition, qualité technologique et techniques d'analyse du lait, In science et technologie du lait. 2002

Lenoir, (1987) : les caseines du lait RLF 440 : 17-23

Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). Les bactéries lactiques. *Microbiologie industrielle: Les micro-organismes d'intérêt industriel*, 170-375.

Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., & Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33-37.

Linden, G. (1987). *Le lait matière première de l'industrie laitière*. Ed CIPIL. Paris. 112-134.

Linden, G. (1987). *Le lait matière première de l'industrie laitière*. Ed CIPIL. Paris. 112-134.

Luquet F M. 1985. *Lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre*. Technique et documentation. Lavoisier Paris. Vol 3, 150 p.

Luquet François M. (1985). *Laits et Produits Laitiers Vache - Brebis - Chèvre*. Technique et documentation-Lavoisier.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., 2003. *Initiation à la technologie fromagère*. Lavoisier, 194 p.

Makhloufi K M., 2011 - Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat, Université pierre et marie curie : 200p.

Mallet, A., Guéguen, M., Desmasures, N., 2010. In Tormo 2010 Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8ème Congrès National de la SFM, 2-4 juin 2010, Marseille.

Marc et Gilbert, 2013 : gestion de l'elvage, bovin laitier

Marti B. et Coulon JB. 1995. Milk production and characteristics. 1-influence of milk product condition on herd milk coltting ability. *Le lait*, 75(3), 61-68.

Martin P., Brignon G., Furet J.P., Leroux C., 1996. The gene encoding  $\alpha$ s1-casein is expressed in human mammary epithelial cells during lactation. *Lait*, 76, 523-535.

## Références bibliographies

---

Mathieu 1998 : initiation à la physico-chimie du lait ED. Tec et Doc .Lavoisier. Paris  
MATHIEU J, 1998. Initiation à la physico-chimie de lait. Paris : Lavoisier, 215p. Mathieu  
J. (1999). Initiation à la physicochimie du lait. Edt Lavoisier, Tec et Doc, Paris. 220p  
(3-190)

Maurer, E. P., L. Brekke, T. Pruitt, and P. B. Duffy (2007), Fine-resolution climate  
projections 489 enhance regional climate change impact studies. *Eos Trans. AGU*,  
88(47), 504.

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  
AV, Ouwehand A (Eds). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 73-102.

Menad, N. (2018). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache  
vis à vis de salmonella sp.thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis  
Mostaganem, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ,196p

Mermouri, L. (2018). Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques  
(*Lactobacillus* spp.), Isolées e Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages  
Conservés par Ensilage, thèse de doctorat. Université des Sciences et de  
la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf,177p.

MITTAINÉ J, (1962). Milk other than cows' Milk. In: *Milk Hygiene*. WHO/FAO, p. 681-  
694.

Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. 2010. Purification,  
characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide  
produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J.*  
*Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.

Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. 2010. Purification,  
characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide  
produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J.*  
*Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.

Mohania, Nagpal, Kumar, Bharadwaj, Yadav O., Jain, Marotta, A. Yadav. (2008).  
Molecular approaches for identification and charecterization of lactic acid bacteria.  
*Journal of Digestive Diasease*, pp. 190-198.

Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., François, S., Mazurier, C., ... & Fouillard, L.  
(2007). Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of  
HLA-G. *Transplantation*, 84(2), 231-237.

Ogier, J.C., Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus*  
genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 291-301.

Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. *Mém. Acad. Roy. Sci. Denmark Sect. Sci.*  
8me, ser. 5: 181–96

Orla-Jensen, S. (1919) The Latic Acid Bacteria. Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen.

Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid  
bacteria. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL*  
*DEKKER-*, 139, 375-396.

## Références bibliographiques

---

Perreau J.M.,(2014) conduire son troupeau de vache laitières Editions France Agricole, Paris,403p

Pougheon S et GoursaudJ; 2001. Le lait caractéristiques physico-chimiques In DEBRYG; Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris. 566 p.

POUGHEON S., (2001). Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 34 (102 pages).

Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C., &Soucaille, P. (2003). Molecular characterization of the 1, 3-propanediol (1, 3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(9), 5010-5015.

RIBADEAU-DUMAS B. (1991). Physicochimie et biochimie des protéines du lait données récentes. Lait, 71, 133-139.

Roca Fernandez A.I (2014) Animal Factors Condition Milk Performance and Quality of Grazing Dairy Cows. Iranian J Appl Anim Sci. 4: 1-20.Rochat, T., Gratadoux, J.J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., van de

Guchte, M., 2006. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. Applied and Environmental Microbiology 72, 5143-5149.

Romain, J., Thomas, C., Michel, M., Pierre, S & Gerard, B. (2008). Les produits laitiers .2ème Edition TEC et DOC. Lavoisier, 184p

Roudaut H. et Lefran E., 2005. Alimentation théorique. Sciences des aliments

Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004 - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A

Steijns, J.M. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix. Intern. Dairy J., 18: 425

Stoll, W. (2003), Vaches laitières-alimentation influence la composition du lait, Édition sagri.france.

Talevski, T., Milosevic, D., Maric, D., Petrovic, D., Talevska, M., Talevska, A. (2009). Biodiversity of ichthyofauna from Prespa Lake, Lake Ohrid and Lake Skadar. Biotech- nology&Biotechnological Equipment, 23, 400–404.

## Références bibliographiques

---

Temmerman, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Identification des bactéries lactiques : méthodes dépendantes et indépendantes de la culture. *Tendances en science et technologie alimentaires*, 15 (7-8), 348-359.

Teuber M., Geis A., 2006. The Genus *Lactococcus*. 4 (1): 205-228

THAPON, 2005. Science et technologie du lait, Agrocampus-Rennes, France: 14. 77 p

Thiao M. (2005). Caractérisation et étude de la survie et de la compétitivité en pépinière et au champ de souches de *Rhizobium* inoculées chez *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.

Thèse de Doctorat. Université Cheikh Anta Diop (UCAD). Sénégal, 116pp.

Tormo H., 2010. Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse de doctorat. Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition.

Toulouse : Université de Toulouse. 2010, 258p.

Van Tieghem, P.E.L. (1878) Sur la gomme de sucrerie (*Leuconostoc mesenteroides*). *Ann. sci. nat. Botan.*, Ser. 6, 7: 180–202

VIGNOLA C. (2002). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechniques, Canada. pp: 3-75

WALSTRA P., GEURTS T.J., NOOMEN A., JELLEMA A., VAN BOEKEL M.A.J.S. 1999. Dairy technology, principles of milk properties and processes. Food science and technology. New York-Basel: Marcel Dekker Inc, p. 325-515.

WATTIAUX, M.A. (1997). Dairy essentials (1st edition) : Nutrition and feeding, The Babcock Institute Publications, University of Wisconsin-Madison, 1-28.

Whiley R A., Hardie J M., 2009. Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. In: De Vos, P; Garrity G., Jones D et al. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Vol 3. New York: Springer. 655-711

Zamberlin S, Antunac N, Havranek J, Samaržija D. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*. 2012;62(2):111–125. [Google Scholar]

Zourain A, Accolas J.P et Desmazes M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria review. *lait*. 72: 1-34. \*Guessas B. et Kihal M.

2005. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian and zone raw goat's milk. *J. biotechnol.* 3; 6, 339-342.

# **Annexes**

### Annexe 01 : Composition des 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
- Glucose.....20 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2 g
- MgSO<sub>4</sub>.....0,25 g
- MnSO<sub>4</sub> .....0,05 g
- Tween 80 .....1 ml
- Agar-Agar.....15 g
- Eau distillée .....1000 ml
- PH = 6,5
- Stérilisation par Autoclave 120°C pendant 20 minutes

#### Milieu GN (Gélose nutritive)

- Peptone.....5g
- Extrait de viande de bœuf.....4g
- Chlorure de sodium .....5g
- Agar.....15g
- Eau.....1000ml
- PH = 7,2
- Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### Milieu Y.M.A ( Yeast Milk Agar)

- Peptone.....5 g
  - Extrait de levure.....3 g
  - Lait en poudre.....10g
  - Agar-Agar.....15 g
  - Eau distillée.....1000
- ml
- PH = 7.2
  - Stérilisation par Autoclave 120°C pendant 20 minutes

### Milieu Hyper saccharose

- Extrait de levure..... 3 g
  - Extrait de viande..... 10 g
  - Peptone..... 2.5 g
  - Saccharose.....100g
  - NaCl.....1 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2 g
  - MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O.....0,2 g
  - Agar.....15 g
  - Eau distillée qsp .....1000
- ml
- PH = 6,8
  - Stérilisation par Autoclave 120°C pendant 20 minutes

### Milieu lait a base de rouge de ruthénium

- Lait en poudre.....10g
- Extrait de levure.....0.1g
- Rouge de ruthénium.....0.08g/l
- Eau distillée .....1000ml
- Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### Eau physiologique

- Chlorure de sodium .....8.5 g/L
- Eau distillée .....1 L
- PH = 6.8
- Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

Clark et Lubs

- 7g/L Peptone tryptique ou polypeptone.....5-
- Glucose.....5
- Phosphate dipotassique.....5
- Eau distillée qsp .....1000
- ml
- PH = 7
- Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min