

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité: Exploitation des Ecosystèmes microbiens laitiers

Par:

Mlle.BENKAROUBA BADR EL BOUDOUR

THEME

**Isolement et identification des *lactocoques*
isolé à partir du lait cru de chèvre et
caractéristique biotechnologique.**

Soutenu le : / / 2017

Devant le jury

Président : Mr.NEMICHE Said

Université de Mostaganem

Examineur : Mr. BENMILOUD Djamel

Université de Mostaganem

Encadreur : Mr.BEKADA Ahmed

Université de Mostaganem

Année universitaire: 2016-2017



Remerciements

*En premier lieu, Je tiens à remercier **Allah**, le créateur pour m'avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*Au terme de ce travail, je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à **Monsieur Houmran** d'avoir accepté parmi son groupe des étudiants et à son laboratoire de rechercher.*

*Je tiens à remercier en premier **Monsieur Nemiche Saïd** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Mes remerciements s'adressent également à **Monsieur Benmiloud Djamel** pour avoir lieu voulu examiner ce travail.*

Je tiens à exprimer mes sincères reconnaissances, mes plus grands

*Respects et ma totale gratitude à mon encadreur **Monsieur Bekada Ahmed** pour tous les efforts, qu'il a orienté en ma faveur tout au long de ce travail.*

*Je tiens à remercier, particulièrement, mon Co-encadreur **Madmoell Houbad Khadidja** pour m'avoir fait profiter de ses grandes compétences et ses conseils judicieux et m'avoir dirigé avec efficacité et avec son soutien et ces encouragements.*

J'adresse également mes vifs remerciements à tous le personnel du laboratoire d'Université de Mostaganem département de biologie.

Je tien à exprimer mes vifs remerciements à tous mes professeurs qui ont contribués à ma formation.

Enfin j'adresse mes remerciements à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Finally des remerciements sincères et des sentiments de reconnaissances particulières s'adressent à ma famille.



DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce projet de fin d'étude....

A mes chers parents :

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Vous avez su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience sans fin, votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Que Dieu, le tout puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A mes adorables sœurs : Siham et Yamina

Et mes cher frère : Kacem et Baghdad

Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, par votre amour dévoué et votre tendresse, pour donner du goût et du sens à ma vie. En témoignage de mon amour et de ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Je prie Dieu, le tout puissant, pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.

A tous mais amis

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail et sur tout qui m'a aidé tout le temps avec ses services Melle.Houbad Khadidja.....Merci.

A tous les enseignants et toutes les enseignantes du département de biologie, sur tous Mr.cheriguene Abderrahim, Mr.Nemiche said.

A ceux qui sèment le bonheur dans mon chemin.

A tous ceux que j'aime.



BADR EL BOUDOUR

SOMMAIRE

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le lait de chèvre

I. Le lait	3
I.1.1. Lait de chèvre.....	3
I.1.2.Principales races caprines	3
I.1.2.1.L'Arabia.....	4
I.1.2.2.La Makati	4
I.1.2.3. Chèvre du M'zab.....	4
I.1.2.4. La chèvre Kabyle	4
I.1.2.5. La montagnarde des autres.....	4
I.1.3. La production du lait de caprine	5
I.1.4.Définition du lait de chèvre.....	5
I.1.5. Composition et propriétés physico-chimique	5
I.1.5.1.PH	6
I.1.5.2. La matière grasse	6
I.1.5.3. Le lactose	7
I.1.5.4. Les minéraux	7
I.1.5.5. Vitamines	8

I.1.5.6. Les protéines	9
I.1.5.7. Système enzymatique	10
I.1.5.8. Substances antibactériennes	11
I.2. Microbiologie du lait de chèvre	11
I.2.1. Flore originelle.....	11
I.2.2. Flore contaminante	12
I.2.3. Flore pathogène.....	13
I.3. Intérêt nutritionnel et diététique du lait de chèvre	13
I.4. Propriétés médicinales	13
I.4.1. Immunoglobulines	14
I.4.2. Lactoferrine.....	14
I.4.3. Lactoperoxydas	14
I.5. Technologie fromagère du lait caprin	15
I.6. Qualités du lait de chèvre.....	15
I.6.1. Qualité nutritionnelle	16
I. 6.2 - Qualité microbiologique	16
I.6.3- Activité lipolytique.....	17
 Chapitre II: Les bactéries lactiques <i>Mesophile</i>	
II.1. Définition	18
II.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques	18
II.3. Origine des bactéries lactiques.....	19
II.4. Habitat	20
II.5. Classifications	21
II.5.1. Les différents genres	22
II.5.1.1. Lactobacillus.....	22
II.5.1.2. Carnobacterium	24
II.5.1.3. Enterococcus, Lactococcus et Vagococcus.....	25
II.5.1.4. Leuconostoc, Oenococcus et Weissella.....	27
II.5.1.5. Aerococcus, Lediococcus et Tetragenococcus	28
II.5.1.6. Bifidobacterium	29
II.6. Propriétés fonctionnelles et techniques	31

II.7. Propriétés fonctionnelles et technologique recherchées	31
II.7.1. Activité acidifiante	31
II.7.2. Production de métabolites d'intérêt	32
II.7.3. Propriétés enzymatiques	32
II.7.4. Propriétés spécifiques aux probiotique.....	32
II.7.5. Critères de performance.....	32

Chapitre III: Genre Lactococcus

III.1. Genre Lactococcus	33
III.2. Habitat et rôle	36
III.3. Métabolisme azotes chez les Lactocoques	38
III.1. Besoins azotes	38
III.4. Lactococcus et les conditions de croissance	39
III.5. Rôle de Lactococcus lactis dans la fabrication du fromage	40
III.6. Les milieu de cultures d'isolement et d'identification des bactéries lactiques dans le lait	41
III.6.1. Le lait milieu de culture	41
III.6.2. Milieux pour Lactocoques.....	42

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériel.....	45
I.1.1. Provenance et prélèvement des échantillons.....	45
I.1.2. Milieux de culture	46
I.1.3. Production chimiques et réactifs	46
I.1.4. Matériel utilisé pour les analyses.....	46
I.1.5. Appareillage.....	46
I.2. Méthode d'analyse.....	47
I.2.1. Techniques d'isolement et de purification.....	47

I.2.1.1. Techniques d'isolement	47
I.2.1.2. Techniques de purification.....	47
I.2.1.3. Conservation des souches	48
I.2.2. Techniques d'identification	48
I.2.2.1. Etude des caractères culturaux.....	48
I.2.2.2. Etude des caractères morphologique des cellules.....	49
I.3. Tests physiologiques et biochimiques	51
I.3.1. Recherche de catalase	51
I.3.2. Type fermentaire.....	51
I.3.3. Culture sur lait Sherman	51
I.3.4. La thermorésistance	52
I.3.5. Tolérance au PH alcalin	52
I.3.6. Culture sur milieu hypersalé	52
I.3.7. Croissance à différentes températures	52
I.3.8. Recherche de l'arginine Di-hydrolase (ADH)	53
I.3.9. La production d'acétoïne	53
I.3.10. Recherche de la citratase.....	54
I.4. L'utilisation des carbohydrates	54
I.5. Activité protéolytique	55
 Chapitre II: Résultat et Discussion	
II.1. Isolement et purification des souches.....	56
I.1.1. Aspect Macroscopiques	56
I.1.2. Teste de la catalase.....	58
I.1.3. Aspect Microscopiques.....	58
II.2. Identification des souches isolées	59
II.2.1. Hydrolyse de l'arginine	59
II.2.2. Type fermentaire	59
II.2.3. Lait de Sherman.....	60
II.2.4. L'utilisation de citrate.....	61

II.2.5. La croissance en condition hostiles	62
II.2.6. Test de la Thermorésistance	64
II.2.7. La Température.....	64
II.2.8. Production de l'acétoine	64
II.3. Profil fermentaire des sucres	67
II.4. Caractérisation de l'activit& protéolytique	69
-Discussion	72
-Conclusion et Perspectives	74.
-Référence bibliographiques	
-Annexes	

Résumé

Les bactéries lactiques représentent un groupe très hétérogène au point de vue phénotypique. Ce groupe se caractérise par des critères communs : le type de Gram, l'absence de la catalase sur toute la production de l'acide lactique. Le genre *Lactococcus* regroupe les Streptocoques non hémolytiques et homofermentaires. Cette étude est consacrée à l'isolement, la purification et l'identification des espèces de lactococcus.

A partir de deux échantillons du lait de chèvre, nous avons isolé 60 isolats ayant un profil homofermentaire à gram positif, à catalase négative à partir des quelques 30 isolats cocci ont été retenus, parmi cette collection des coques on se basant sur les résultats du test de bleu de Sherman, seulement 15 isolats représentatifs de la flore dominante ont été identifiés de manière complète par méthodes phénotypiques.

Les résultats des tests biochimiques, physiologiques et le profil fermentaire effectués sur des souches isolées et purifiées ont permis d'identifier les espèces *Lactococcus plantarum* (V27, V6, V10) *Lactococcus raffinolactis* (V13, v16), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (V21, v7, v33, v19, v8), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar. diacetylactis* (V31, v9, v25) et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (V27, v3).

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que la plupart des souches présentent un bon pouvoir protéolytique.

Mots clés: lait de chèvre, lactococcus, pouvoir protéolytique, bleu de Sherman,

Abstract

The lactic bacteria represent a very heterogeneous group from the phenotypic point of view. This group is characterized by common criteria: the type of Gram, the absence of catalase on the whole production of lactic acid. The recently created genus *Lactococcus* includes non-haemolytic and homofermentary streptococci. Our theme is devoted to the isolation, purification and identification of *Lactococcus* species.

From two samples of goat milk we isolated 60 isolates with a negative catalase gram-positive homofermental profile from which 30 isolates were selected from this collection of shells based on the results of the test Sherman blue, only 15 representative isolates of the dominant flora were fully identified by phenotypic methods.

The results of the biochemical, physiological and fermentation tests carried out on isolated and purified strains have made it possible to identify the following species:

-V27, V6, V10, *Lactococcus plantarum*

-V13, v16, *Lactococcus raffinolactis*

-V21, v7, v33, v19, v8, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

-V31, v9, v25, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

-V27, v3, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

The results of the technological aptitude assessment indicate that most strains exhibit good proteolytic potency.

Key words: goat milk, *Lactococcus*, proteolytic power, Sherman blue,

ملخص

بكتيريا اللبنية هي ظاهريا مجموعة متنوعة للغاية.

وتتميز هذه المجموعة من المعايير المشتركة: نوع فحص غرام للبكتيريا وغياب الكاتلاز إنتاج حمض اللبني. و أنشئت مؤخرا جماعات العقديات الغير الانحلالية و متجانسة التخدير.

ويخصص موضوعنا إلى عزل وتنقية وتحديد الأنواع هذه بكتيريا اللبنية.

من عينتين من حليب الماعز، عزلنا 60 عزلة متجانسة التخدير غرام إيجابي، سلبى، تم تحديد 15 فقط ممثل العزلات المهيمنة السائدة شامل بالطرق المظهرية.

لديها نتائج الاختبارات البيوكيميائية، لمحة الفسيولوجية والتخمير التي أجريت على سلالات معزولة وتنقيته للتعرف على الأنواع التالية:

- V27, V6, V10, *Lactococcusplantarum*
- V13, v16, *Lactococcusraffinolactis*
- V21, v7, v33, v19, v8, *Lactococcuslactissubsp. Lactis*
- V31, v9, v25, *Lactococcuslactissubsp.lactisbiovar. diacetyllactis*
- V27, v3, *Lactococcuslactissubsp. Cremoris*

وتشير نتائج تقييم المهارات التكنولوجية أن معظم سلالات لها نشاط بروتين جيد.

كلمات البحث : نشاط بروتين ، شيرمان الأزرق *Lactococcus*: حليب الماعز،

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: <i>Composition moyenne du lait de chèvre</i>	6
Tableau 02: <i>Teneur en minéraux et en oligo-élément du lait de chèvre</i>	8
Tableau 3: <i>Teneur en vitamines du lait de chèvre</i>	8
Tableau 4: <i>Composition moyenne en g/l et distribution des protéines dans le lait de chèvre</i>	9
Tableau 5: <i>Caractéristiques des principaux enzymes du lait de chèvre</i>	10
Tableau 6: <i>Flore originelle du lait cru</i>	12
Tableau 7: <i>Critères différentiels des trois groupes de lactobacillus</i>	23
Tableau 8: <i>Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques</i>	35
Tableau 9: <i>Caractéristiques physiologiques et biochimiques du genre lactococcus</i>	36
Tableau 10: <i>Profil fermentaire du genre Lactococcus</i>	36
Tableau 11: <i>Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des Exploitations agricoles</i>	38
Tableau 12: Les lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits Laitiers.....	38
Tableau 13: Milieux de culture pour la croissance de micro-organismes importants en laiterie ...	43
Tableau 14: Résultats de la croissance des 18 souches (GEMELAS et al., 2013) sur huit milieux de culture (FSDA, Elliker modifié, M17 NaCl, PCA + lait, Elliker, Chalmers modifié, KCA modifié, Turner et sur le milieu du M17 modifié	44

Tableau 15 : Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre <i>Lactococcus</i> isolées du lait cru de caprin	66
Tableau 16 : Profile fermentaires des isolats du genre présumé <i>Lactococcus</i> sp.....	68
Tableau17: Activité protéolytique chez les lactocoques	70

LISTE DES FIGURES

Figure1: <i>Triglycérides et acides</i>	8
Figure 2: <i>Principales voies Assurant le transport et le metabolism du glucose par les bactérieslactiques</i>	19
Figure 3: <i>Schéma montrant l'arbe phylogénique des bactéries lactiques ycompris des genres apparent</i>	21
Figure 4: <i>Morphologie de A) Lactobacillus casei and B) Lactobacillus acidophilus</i>	24
Figure 5: <i>Morphologie en microscopie électronique de Streptococcus thermophilus</i>	26
Figure 6: <i>Morphologie en microscopie électronique de Lactococcus lactis subsp. "diacetylactis"</i>	26
Figure 7: <i>Fixation des Leuconostocs sur les moules en grès-vernisé</i>	28
Figure 8: <i>Morphologie en microscopie électronique de Pediococcus sp</i>	29
Figure 9: <i>Morphologie en microscopie électronique de Bifidobacterium animalis</i>	30
Figure 10: <i>Lactococcus lactis subsp lactis sous forme de cellules ovoïdes par paire (A), et en chaînette (B) selon la souche</i>	33
Figure 11: <i>Métabolisme du pyruvate chez L. lactis</i>	35
Figure 12 : <i>échantillon de lait de chèvre prélevés dans la région</i>	45
Figure 13: <i>préparation des délutions a partir du lait de chèvre</i>	47
Figure 14: <i>Létape de purification sur le mileux ELLIKER lactose</i>	48
Figure 15: <i>Diagramme d'isolement et de purification des lactocoques</i>	50
Figure 16: <i>Clé d'identification des bactéries à Gram positif (Carr et al., 2002)</i>	53
Figure17: <i>Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactique sur milieu gélosie Elliker lactose</i>	56

Figure 18: Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide ELLIKER lactose	57
Figure 19: Aspect macroscopique des colonies de <i>Lactococcus sp.</i> sur milieu solide Elliker lactose	57
Figure 20 : Aspect microscopique de <i>Lactococcus sp</i> après coloration de GRAM (Gr : X1000).....	58
Figure 21 : La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH) après 48h	59
Figure 22 : Résultat de type fermentaire des isolats	59
Figure 23 : Résultat du test de lait de Sherman a 3%.....	60
Figure 24 : Résultat du test de lait de Sherman 0,3 % de Blue de méthylène ; 0.1 % de bleu de méthylène.....	60
Figure 25 : Test de réduction de citrate sur milieu KMK	61
Figure 26 : Résultat du test de résistance sur milieu hyper salé (4% NaCl)	61
Figure 27: Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (6,5% NaCl)	61
Figure 28: Résultat de la croissance des isolats à pH 4,(souche V ₂₇).....	62
Figure 29: Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6	63
Figure 30: Résultat de test de la thermorésistance	63
Figure 31 : Résultat du test de croissance à 10°C	64
Figure 32: Test de la production d'acétoïne	65
Figure 33 : Résultats du test de sucre des isolats.....	67
Figure 34 : Activité protéolytique sur milieu Agar au lait.	69
Figure 35: Distribution des espèces de <i>lactococcus</i> selon le nombre des souches	73

LISTE DES ABREVIATIONS

Noms de genres bactériens

B. : *Bacillus*

BF. : *Bifidobacterium*

E. : *Escherichia*

En. : *Enterococcus*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

P. : *Pediococcus*

S. : *Staphylococcus*

St. : *Streptococcus*

Unités de mesures

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

cm, mm, nm : Centimètre, millimètre, nanomètre

g, mg : Gramme, milligramme

h, min, s : heure, minute, seconde

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

N : Normalité

U : Unité

UI : Unité Internationale

Autres abréviations:

ADH : Arginine Dihydrolase

Amd : amidon

ARA : arabinose

ssp. : Sous espèce

EPS : Exopolysaccharides

ESC : esculine

FAO : Food and Agriculture Organization

GAL : galactose

GLYG : glycogène
Lac : lactose

Mal : maltose

Man : mannitol

Mél : mélibiose

Raf : raffinose

Rib : ribose

RAF : raffinose

Sac : saccharose

qsp : Quantité suffisante pour

pH : Potentiel d'Hydrogène

sp. : Espèce non précisée

SOR : sorbitol

UFC : Unité Formant Colonie

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Amd : amidon

BAL, BL : Bactérie Lactique

CO₂ : dioxyde de carbone

G : Guanine

L(+) : produisant L'acide lactique

NaCl : Chlorure de sodium

Km : Kilomètre

KMK : Kempler Mc Kay

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LAIT DE CHEVRE

CHAPITRE II

GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES

CHAPITRE III

GENRE LACTOCOCCUS

PARTIE EXPERIMENTALES

PARTIE EXPERIMENTALES

CHAPITRE I

Materiel et Methodes

CHAPITRE II

Résultat et Discussion

DICSUSSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Références bibliographiques

Bibliographies

Archambault, M., Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire. 2004 Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. Page 04

Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.*, 3: 25-31

Axelsson Lars, 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology **In** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 19-33

Accolas J.P., Bloquel R ; et Regnier J.(1977). Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ; le lait.67 : 1-45.

Archambault M, (2004)., Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire., Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-48.

Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (Ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.

Al-Zouzoreky. N et Sandine W.E. (1991)., Lactococcus genuis, a selective and differential agar medium ; Volume 56, NO. 6 Journal of Food Science- 1729.

Archambault M, (2004)., Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens

thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-45.

Aussel X. (2002). Etude de bactéries lactiques isolées du shubat. Rapport de stage au CIRAD-AMIS, BTSA industrie agroalimentaire.

Agrawal R. P.; Swami S. C.; Beniwal R.; Kochar D. K.; Sahani M. S.; Tuteja F. C.; Ghouri S. K. J. (2003). Effect of milk on glycemc control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled study. *J.Camel Res. Pract.*, 10, p.55.

Archambault M, (2004).., Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-55.

Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (Ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects.* Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.

Ammor S., Rachman C., Chaillou S., Prevost H., Dousset X. et Zagorec M. 2005. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small scale producing .

Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (Ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects.* Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.

BORNAREL P., BOULBAYE P., HUGOO P. et GAOU K., (2003). Etat de la situation sanitaire des produits laitiers commercialisés dans la zone préurbaine de N'jaména. *Renc Rech Rumin*, 18 : 12-13.

BRÛLE G., LENOIR J. et REMEUF F., (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. *Le fromage*, partie 1, chap. 1, Edition Eck A., Gillis J. C. Techniques et documentation Lavoisier.Paris. PP 6-12.

BUDIN J.P., (2000). Présentation de l'évaluation sensorielle : valorisation des produits laitiers des ovins et des caprins en méditerranée. Ed. Ciheam, France, 4.

BUGAUD C., BUCHIN S., HAUWUY A. et COULON J.B., (2002). Texture et flaveur du fromage selon la nature du pâturage. *Production Animales*, 15 (1) : 31-36.

BOUILLON J. (1994). Du gène au fromage : Le polymorphisme de la caséine α S1 caprine, ses effets, son évolution. *INRA Productions Animales*, 7(1), 10

BRIGNON., LILIANA DI STASIO. and JEUNET R. (1987). A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α S1-casein. *Genetics, Sélection and Evolution*, 19(4),

Badis,A.,Laouarbdia Selami,N.,Guertarni,D., Kihal,M., et Ouzrout,R.,(2005) . Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *Sciences et Technologie*. 23: 46-50.

Barral J, Doutart E, Guezenoc C, Karsenti C, Laithier C. 2008. Influence de la pratique de la prématuration sur la qualité du lait, l'acidification et la qualité des fromages de chèvre de type lactique. Rapport technique, Actilait,

Bruno ZELLER (2005). LEFROMAGE DE CHÈVRE : SPÉCIFICITÉS TECHNOLOGIQUES ET ÉCONOMIQUES. Thèse de doctorat. Université PaulSabatier de Toulouse. F

CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. et BESANON P., (1983). Qualité et caractères organoleptiques des aliments : introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP 30-65.

CEBO C., CAILLAT H., BOUVIER F., MARTIN P. et RUPP R. (2009). Composition de la fraction protéique de la membrane du globule gras et résistance aux mammites chez les caprins. *Rencontres Recherches Ruminants*, 7

COULON J.B., DELACROIX-BUCHET A., MARTIN B. et PIRISI A. (2005). Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. *INRA Productions Animales*, 18 (1),

Corsy J.C., 1991. La chèvre. Ed. *La maison rustique*, Paris. pp: 13-33

Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int. J. Food Microbiol.*

Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G. Et Leloir J., (1997). La biochimie de l'affinage. Le fromage, partie 1, chap. 4, Edition Eck A., Gillis J. C. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP 73-74.

DE ROISSART H. et LUQUET F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Loriga, France, 1. pp. 1-18.

DELLAGLIO F., (1988). Starters for fermented milks, section 3: thermophilic starters in "fermented milks, sciences and technology". *Bulletin Fil*, 227: 27-33.

DELLAGLIO F., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed. Loriga Lavoisier, Paris, 19-33.

DORIOZ J.M.,(2001). Terroir montagnard et production fromagère : rôle du milieu physique et végétal. *FRA. Nature*, 5 : 1-5.

DUDEZ P. et BROUTIN A., (2003). Quatre méthodes simples pour contrôler la qualité des laits et des produits laitiers. *Le Lait*, 62: 17-18.

De Roissart H. Et Luquet F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Loriga, France, vol. 1. pp. 4-75.

Daoudi L., (2000), Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* UL719. , Thèse de doctorat. Faculté des études supérieures. Université Laval .Canada.

De Roissart H. Et Luquet F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-75.

Dellaglio F. ; De Roissart H. ; Torriani S. ; Curk M.C. ; Janssens D., (1994).Caracteristiques générale des bacteries lactiques in « Bacterie lactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

Desmazeaud M.J., De Roissart H. (1994). Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». De Roissard et Luquet, Tech.Doc.,Lavoisier, Paris.

Desmaures, N., Bazin, F., Gueguen, M., 1997a. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 83, 53.

FAO, (2002). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 5: laits fermentés. *Collection FAO / Alimentation et Nutrition*, p.6-11.

Franciosi Elena, Settanni Luca, Cavazza Agostino, Poznanski Elisa, 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.*, 19: 4-23

GROSCLAUDE F., MARIE-FRANCOISE MAHE., GHISLAINE BRIGNON ;LILIANA DI STASIO.and JEUNET R.(1987). A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat As1-casein. *Genetics, Sélection and Evolutio*;19(4)

GROSCLAUDE F., RICORDEAU G., MARTIN P., REMEUF F., VASSAL L. et BOUILLON J. (1994). Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine aS1 caprine , ses effets,son évolution.*INRA Productions Animales*,7(1),10

GUILHERME NURES DE SOUZA., JOSE RENAL DI FEITOSA BRITO MARIA APARECIDA., VASCONCELOS PAIVA BRITO CARLA LANGE., CRISTIANO GOMES DE FARIRA LUCIANO CASTRO DUTRA DE MORAES. and RAFAEL GUEDES FONSECA YURI DE ALMEIDA SILVA. (2009). Composition and bulk tank somatic cell counts of milk from dairy goat herds in southeastern Brazil. *Brazilian Journal*

Research Animal Science, 46,

Guiraud J.P. et Galzy P., (1980)., L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle.

Hassan A.A.; Hagrass A.E.; Soryal K.A. Et El-Shabrawy S.A. (1987). Physicochemical properties of camel milk during lactation period. *Egyptian J. Food Sci.*, 15 , 1-14.

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre,

Larpent J-P., 1996a. Les bactéries lactiques **In** *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires.* Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-45

LARPENT J.P., 1997. *Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier.* Paris. 7-45.

LEVEAU J.Y. & BOUIX M. 'LA FLORE LACTIQUE'1980, dans „technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires“. Bourgeois C M, Leveau J Y, A.p r i a. Paris. 4-74.

Langella P. ; Nouaille S. ; Commissaire J. ; Bolotine A. ; Gruss A. Et Le Loir Y. (2001). Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 37-45.

Larpent J.P., Copin M.P., Germonville A., Jacquet M. Et Thetas J.L. (1997). *Microbiologie du lait et des produits laitiers ; in : « Microbiologie alimentaire ».* ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.

Leroy F. et de Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industrie. *Trends Food Sci. Technol.* 15 :61-72.

MAHE S. (1996). Valeur nutritionnelle du lait en alimentation humaine. Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. Actes du colloque : Le lait de chèvre, un atout pour la santé, INRA. Niort, France. P. 14.

MAURER J. ; BERGER T. ; AMREIN R.et SCHAEAREN W. (2013). Critères de qualité pour le lait de chèvre et de brebis: exigences et valeurs indicatives ainsi que propositions pour un paiement du lait selon des caractéristiques qualitative. ALP forum n° 9:pp. 4-6.

MIRANDA G. et GRIPON J.C. (1986). Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. Lait, **66**,pp. 14-15.

Marchal N., Obre A., Buttion R., Boudon J.L. Et Richard C.L. (1982). Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris.

Mäyrä-Mäkinen A. Et Bigret. (1998). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York,

Nehal F.,(2007), Isolement et caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* à partir de différents laits dans le périmètre du moyen Cheliff. Mémoire de magister soutenu le 30-09-2007. Université Hassiba BEN BOUALI-Chlef. Algérie.

PAUL ROSS R.; MORGAN S. et HILL C. (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbio.* **79**, pp.3 – 16.

Pougheon Sandra, Goursaud Jean, 2001. Le lait: caractéristiques physicochimiques **In** Lait, nutrition et santé. Debry G. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 3-42

POT, B. ,2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F.M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, Franc.

Patrignani F.; Lanciotti R.; Mathara J. M.; Guerzoni M. E. Et Paul Ross R.; Morgan S. Et Hill C. (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* 79: 3-43.

SALMINEN S. et VON WARTGHI A. (2012). Lactic acid bacteria: *Microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 12.

Schleifer K.H.et Kilpper-Bälz R., 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 23-31.

Sherman J.M., 1937. The streptococci. *Bacterial. Rev.*, 1: 26-27.

Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol*, 36.

Suma K., Misra M.C., Varadaraj M.C., 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat- stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40:29-31.

SIERRA G., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23,19-22.

SOZZI T., GNAEGI F., D'AMICO N., HOSE H., 1982. Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 14, 22.

Saidi N., Guessas B., Bensalah,F.,Badis,A.,Hadadji,M.,Henni D.E., Previst,H.,Kihal,M., (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides*.01 :19.

Sherman J M, (1973), the streptococci. *Bacteriological review* .1, 26-27.

Sharpe M.E., Fryer T.F., Smith (D.G.) (1966)., Identification of the lactic acid bacteria. In Gibbs (B.M.), Skinner (F.A.) (Eds.), Identification methods for microbiologists. Part A.- London: Acad. Press, , p. 60-74.

Tailliez Patrick, 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait.*, 81: 19-23.

Thapa N., Pal J. et Tamang J.P., 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int.J. Food Microbiol.* 107 : 46-47.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage.* 1 :68.

Vollenweider S., 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 64.

Waes G., "The Enumeration of Aromabacteria in BD Starters," *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Vol. 22, 1968, pp. 45-56.

Zarour K., Benmechernene Z., Hadadji M, Moussa Boudjemaa B. , Henni J., et Kihal M (2013).Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroïdes* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie : « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques.

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lait>

ANNEXES

Annexe I

Milieux de cultures :

Milieu Elliker lactosé (Elliker, 1956) :

Composant	g/l
Tryptone	20g
Extrait de levure	5g
Gélatine	2,5g
NaCl	4g
Acétate de Sodium	1,5g
Glucose	5g
Lactose	10g
Acide ascorbique	0,5g
L'eau distillée	950ml

pH= 7. autoclavage 120°C pendant 20mn

Eau physiologie :

Composant	g/l
Chlorure de sodium	8,5g
Peptone	0,5g
Eau distillée	950ml

pH=7. autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Bouillon hypersalé :

Composant	g/l
Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl	40/65g
Eau distillée	950ml

pH=7,2 ; autoclavage 120°C pendant 20mn

Gélose nutritive GN :

Préparation du milieu : le milieu est préparé à partir du bouillon nutritif Merck(8g/l),mélange d'agar (15.0g/l). Additionner les ingrédients à l'eau distillée dans un volume de un litre, agiter ensuite avec chauffage et distribuer dans des tubes à essais. Enfin autoclaver 15 min à 15 psi (121°C). le pH du milieu est ajusté à 7+- 0.2à 25°C. Extrait de

composant	g/l
Extrait de levure	1g
Extrait de viande	2g
peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar-Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH=7.4; Autoclavage 120°C pdt 20mn

Lait écrémé :

Composant	g/l
Lait écrémé en poudre	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée	950ml

Autoclavage 110°C pendant 10 min

Lait de Sherman

Composant	g/l
Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée	950ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0.1% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20mn. Et pour avoir un lait à 3% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1 ml de bleu de méthylène à 3%.

Clark et Lubs :

Composant	G /L
Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	950ml

PH=7,4.

Milieu KMK (Kempner Mc Kay, 1980) :

Composant	g/l
Biopolytone	3g
Glucose	2,5g
Agar	15g
Eau distillée	950ml

PH=6,6.

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 μm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

Milieu M16BCP (Thomas, 1973) :

Composant	g/l
Peptone papinique de soja	5g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Lactose	2g
Acide ascorbique	0,5g
Acétate de sodium	1,8g
L'arginine	4g
Pourpre de bromocrésol	0,05g
Eau dictillée	950ml

pH=6,5. Autoclavage à 120°C pendant 20min.

Annexe II

Réactifs et tampon

Réactif VPI et VPII:

Réactif VPI : solution de soude (NaOH) à 16% (p/v) dans l'eau distillée.

Réactif VPII : α -naphtol à 6% (p/v) dans l'alcool

Solution de phénolphthaline à 1% :

Phénolphthaline déshydraté 1g

Ethanol 95% 100 ml

❖ **Observation à l'état frais :**

Examen à l'état frais : pour apprécier la mobilité et la morphologie bactérienne, nous avons réalisés suivi les étapes suivantes :

- Premièrement, nous préparons une lame et une lamelle de verre propre et sec,
- Déposer une goutte de l'eau physiologique sur lamelle,
- Au tour de bec benzène, nous prélevons une colonie de boîte étudié qui est déposée au centre de la lame (sur la goutte de l'eau physiologique), Bien étalé,
- Recouverte d'une lamelle, L'observation est faite rapidement dans à l'objectif 40.

❖ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- * Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- * Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- * Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- * Décolorer avec de l'alcool, puis rincer à l'eau ;
- * Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- * Laver à l'eau ;
- * Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose

INTRODUCTION:

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. En regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration en nutriments. Mais le lait n'a pas seulement un intérêt alimentaire, il occupe une place centrale dans l'imaginaire des algériens. Ce n'est d'ailleurs pas par hasard qu'il est offert comme signe de bienvenue, traduisant, ainsi par l'acte notre tradition d'hospitalité.

En Algérie, la production de lait de chèvre a longtemps été marginalisée, développée à l'échelle familiale dans les régions montagneuses de la Kabylie, et consommé à l'état cru ou fermenté. Dans le Monde, une plus grande importance est donnée à l'élevage. La consommation de lait et de fromages de chèvre, pour la survie et l'économie de plusieurs pays en voie de développement (Asie, Afrique et l'Amérique du sud) et les pays développés (Europe et l'Amérique du nord).

Il est probable que le lait de chèvre en Algérie, comme le lait de vache, soit utilisé Traditionnellement par les éleveurs de puis fort longtemps mais sa valorisation industrielle est Souvent très restreinte, voir inexistante. Il ne manque pourtant pas d'atouts ; Le lait de chèvre est considéré comme étant l'un des plus complets et des mieux équilibrés parmi les laits (AMROUN-LAGA ET ZERROUKI, 2011).les recherches en cours commencent à mettre en évidence ses propriétés diététiques (forte teneur en caséine β , hypoallergénicité.) (El Marrakchi et Hamama, 2000).Le goût chèvre est souvent peu apprécié, jugé trop fort par les consommateurs habitués aux produits de vache. Par contre, dans les pays industrialisés, le lait de chèvre fait d'excellents fromages. Pourquoi pas en Algérie ?

La microflore du lait cru est composée essentiellement de bactéries. Ces dernières peuvent être Gram positives ou Gram négatives. La microflore technologique est utile à l'industrie agro-alimentaire. Parmi les groupes lactiques importants, se révèlent les *Lactocoques* qui sont d'une grande importance à l'échelle industrielle et sont largement utilisé dans l'industrie

Alimentaire comme souches «starter». Ils sont dans la production de fromage, de laits fermentés vu la difficulté de l'isolement de cette souche et son importance illustre dans le domaine agro-alimentaire. En effet, les milieux de cultures destinés à l'isolement sélectif des bactéries d'importance technologique sont peu disponibles dans la littérature, particulièrement pour le genre *Lactococcus*.

L'objectif de ce travail, vise à la l'obtention d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait de chèvre cru, en suivant les démarches qui consistent à:

- Isolement de la souche sur milieu elliker sélectif;
- Pré-identification, par des tests physico-chimiques et biochimiques;
- Repiquages successifs afin de la purifier;
- Conservation de la souche dans un milieu approprié.

Ce mémoire est subdivisé en deux grandes parties. Le premier est une revue bibliographie comportant un chapitre sur des généralités et un ensemble de connaissances actualisées sur le lait de chèvre, suivi par un chapitre qui a porté sur les bactéries lactiques mésophiles et enfin un troisième chapitre consacré au genre *Lactococcus* de point de vue habitat, métabolisme, les conditions de croissance, rôle dans la fabrication du fromage et les milieux de culture destinés à son isolement et son identification . La seconde partie expérimentale comporte un chapitre de matériel et méthodes, suivi par la présentation des résultats obtenus, une discussion et en fin une conclusion.

Chapitre I:**I.1. LAIT:**

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes: « le lait est le produit intégral de la traite total et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpent J-P., 1996b**).

I.1.1-Lait de chèvre :

En Algérie, la production de lait de chèvre a longtemps été marginalisée, développée à l'échelle familiale dans les régions montagneuses de la Kabylie, et consommé à l'état cru ou fermenté. Dans le Monde, une plus grande importance est donnée à l'élevage. La consommation de lait et de fromages de chèvre, pour la survie et l'économie de plusieurs pays en voie de développement (Asie, Afrique et l'Amérique du sud) et les pays développés (Europe et l'Amérique du nord). Le lait de chèvre de par son goût âcre n'est pas toujours apprécié par les consommateurs, à l'inverse, sa transformation en fromages le rend plus digeste et très apprécié tant du point de vue organoleptique que nutritionnel. Plusieurs microorganismes bactéries levures et moisissures sont présents dans le lait de chèvre formant ainsi un écosystème microbien complexe. Les bactéries *Micrococcus* sp. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc* peuvent être naturellement présentes dans le lait ou incluses dans la fabrication et l'affinage du fromage en tant que ferments. Ainsi, la production de fromage de chèvre a beaucoup évolué.

I.1.2-Principales races caprines algérienne :

L'espèce caprine se présente en Algérie sous la forme d'une mosaïque de populations très variées appartenant toutes à des populations traditionnelles. Elle comprend en plus de ces populations locales, à sang généralement Nubien, des animaux mélangés aux sangs issus de races standardisées. La population caprine d'Algérie renferme 05 types majeurs, l'Arabia, la Makatia, la chèvre du M'zab, la chèvre Kabyle (naine de kabyle), la montagnarde des Aurès (**TEJANI, 2010**).

I.1.2.1 / L'Arabia :

La plus dominante de ces populations est la chèvre arabe dite population Arabo maghrébine. Elle se localise en zones steppiques ou semi steppiques et présente un format peu développé, brun foncé et dépourvue de corne. Au niveau phénotypique, elle manifeste des caractères plus homogènes: Robe noire à long poils, pattes blanches au-dessus du genou, raies blanches et fauves sur le visage, taches blanches à l'arrière des cuisses. Cet animal est parfaitement adapté aux contraintes des parcours et semble posséder de bonnes aptitudes de reproduction. La chèvre est

Principalement élevée pour la viande de chevreaux même si son lait, produit en faible quantité, représente un intérêt indéniable (TEJANI, 2010).

I.1.2.2/ La Makatia :

Aux caractères assez hétérogènes, robe polychrome aux poils courts, oreilles tombantes, elle semble être le produit de multiples croisements réalisés à partir de races méditerranéennes. Elle est peu résistante sur les parcours et son intérêt réside dans sa production laitière et son adaptation à l'environnement. Ces animaux sont également saisonnés (TEJANI, 2010).

I.1.2.3 / chèvre du M'zab:

Elle se trouve surtout dans le sud et serait un noyau de l'Ombrine qui est une bonne laitière et très féconde. Cette race est très appréciée dans l'Est méditerranéen pour sa capacité laitière et fait partie du rameau Nubio-Syrien (TEJANI K, 2010).

I.1.1.4 / La chèvre Kabyle (naine de Kabyle):

C'est une chèvre autochtone qui peuple les massifs montagneux de la Kabylie et des Aurès. Elle est robuste et massive, de petite taille, de couleur noirâtre ou blanchâtre avec de longs poils. C'est une mauvaise laitière et est appréciée plutôt pour sa viande (TEJANI, 2010).

I.1.1.5 / La montagnarde des Aurès:

C'est une chèvre qui ressemble au type de Kabylie. Elle est très appréciée pour la quantité et la longueur de ses poils. Elle se distingue des autres populations par la longueur des oreilles allongées, constituant une défense contre les effets de la sécheresse et par la longueur des poils qui est à la base d'une industrie artisanale (TEJANI, 2010).

I.1.3-Production laitière caprine:

Le consommateur recherche de plus en plus des produits particuliers en matière d'origine et de goût. C'est pourquoi les produits à base de lait de chèvre sont très recherchés et la production a fortement augmenté au cours de ces dernières années. Alors que de nombreuses chèvres sont détenues en petits troupeaux et que leur élevage représente souvent une activité accessoire, 20.000 tonnes de lait de chèvre au France, sont transformée chaque année, en fromage et en d'autres produits à base de lait. Afin de pouvoir garantir la qualité et la sécurité des produits, le besoin de méthodes simples et fiables pour la surveillance de la qualité du lait de chèvre croît (**WALTER, 2007**).

I.1.4- Définition du lait de chèvre :

Le lait de chèvre est un liquide blanc ou mât, due à l'absence de β -carotène contrairement au lait de vache. Il a une odeur assez neutre. Parfois en fin de lactation, une odeur caprine apparait et après stockage au froid il acquiert une saveur caractéristique (**BOSSET *et al*, 2000**). Il donne une impression bien homogène c'est-à-dire ni trop fluide ni trop épais. Du point de vue de ses qualités nutritives et digestives, le lait de chèvre possède une bonne valeur nutritionnelle.

Ces qualités diététiques sont la conséquence d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques (**MONTEL, 2003**).

I.1.5- Composition et propriétés physico-chimiques du lait:

Le lait de chèvre a une composition et des caractères physico-chimiques particuliers qui les différencient nettement du lait de vache (**ABI AZAR, 2007**). Le lait sécrété par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes, et contient les mêmes catégories de composantes: eau, matière grasse, lactose, minéraux et protéines (**CHILLIARD *et SAUVANT*, 1987**).

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de chèvre.

Constituents	%
Eau	87,1
Matière sèche totals	12,9
Matière grasses	4,1
Matière azotées	3,5
Lactose	4,5
Minéraux	0,8

Source : St-Gelais et al., (1999).

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion (FAO, 2002). Il se trouve sous deux formes: l'eau libre (96 % de la totalité) et l'eau liée à la matière sèche (4 %).

L'eau libre par sa mobilité est très réactive, elle autorise l'état de solution du lactose et d'une partie des minéraux et rend le milieu très favorable au développement des microorganismes. L'eau liée est fortement associée aux protéines, à la membrane des globules gras et à certains sels minéraux; elle n'est pas affectée par les procédés classiques de transformation et n'intervient pas dans les réactions chimiques, physiques et enzymatiques (**Vignola et al. 2002**).

1.1.5.1/ Le PH

Le pH du lait normal varie de 6,2 à 6,8. La majorité des laits ont un pH situé entre 6,4 et 6,6 et l'acidité entre 14 - 18° Dornic. Sa densité à 15°C est de l'ordre de 1.027-1.035 et son point d'ébullition de l'ordre 100.5°C. Le point de congélation varie entre - 0,550 et - 0,583°C (**ANSART, 1995**). Sa teneur en eau égale à 87% (**AMIOT et al., 2002**).

1.1.5.2/ La matière grasse

La matière grasse représente une source importante d'énergie. Elle se présente sous forme de triglycérides, pauvres en acides gras polyinsaturés qui sont nécessaires au métabolisme humain (**TOUHAMI, 1996**). Le lait caprin est aussi plus difficile à écrémer que le lait de vache du fait que les globules gras caprins se démarquent par leur petite taille (**HOLMES et al, 1945 ; JEAN AMIOT et al., 2002**). Il se caractérise par la présence, d'acides gras à

chaîne relativement courte (dont les acides caproïque et caprylique) qui peuvent être absorbés par un mécanisme plus simple que celui des acides gras à chaîne longue (DESJEUX, 1993).

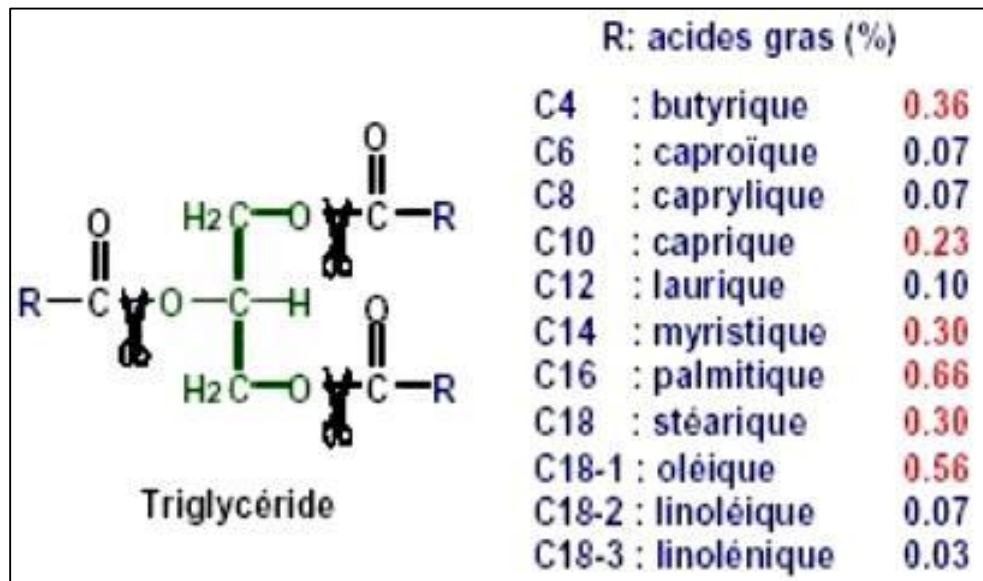


Figure 1: Triglycérides et acides Source : Wolff et Fabien, (1998).

I.1.5.3 /Le lactose

Le lactose est le glucide le plus important du lait, d'autres glucides peuvent provenir de l'hydrolyse du lactose (glucose, galactose). Certains glucides peuvent se combiner aux protéines, formant des glycoprotéines ou peuvent se trouver sous forme libre (HOLMES *et al.*, 1945 ; AMIOT *et al.*, 2002). Il constitue ainsi de source d'énergie et un apport de galactose pour le développement du système nerveux central (MAHE, 1996).

Le lait de chèvre est moins riche en lactose, par rapport au lait humain (70g/l), avec une variation allant de 40.6 à 42.7 g/l. Sa teneur en ce nutriment est proche de celle du le lait de vache (44.13g/l) (MOUALEK, 2011 ; SIBOUKEUR, 2007).

I. 1.5.4/ Les minéraux

Le lait contient tous les minéraux considérés comme essentiels pour la nutrition humaine (KEBCHAOU, 2013). La composition minérale du lait de chèvre est proche de celle du lait de vache. Il est légèrement plus riche en Calcium (Ca) et phosphate (P) et nettement plus riche en Magnésium, Potassium et Chlore (GUEGUEN, 1996).

Tableau 2: Teneur en minéraux et en oligo-élément du lait de chèvre (g/l).

Minéraux et oligo-éléments	Concentration g/l
Sodium	0,37
Potassium	1,55
Calcium	1,35
Magnésium	0,14
Phosphore	0,92
Chlore	2,20
Acide citrique	1,10
Fer	0,55
Cuivre	0,40
Zinc	3,20
Manganèse	0,06

Source: St-Gelais et al., (1999).

I. 1.5.5 /Vitamines

Le lait de chèvre comporte vitamine D et de deux fois plus de vitamine A que le lait de vache. Elle se retrouve exclusivement sous forme de rétinol. Le rétinol s'avère être la forme la plus active et la plus rapidement utilisable par le corps (**Debry, 2001**). Le lait de chèvre ne contient que des traces de carotène. Ce déficit en carotène du lait et des fromages de chèvre est à l'origine de leur blancheur caractéristique.

La niacine joue un rôle important dans l'utilisation des protéines, des glucides et des lipides.

Le lait de chèvre en contient trois fois plus que le lait de vache et autant que le lait maternel (**Adrianet al., 1995**).

Le tableau 3 regroupe les données concernant les vitamines hydro et liposolubles.

Tableau 3: Teneur en vitamines du lait de chèvre (g/l).

Vitamins	Concentration g/l
Vitamine A	0,24
β -carotenes	<0,10
Vitamine E	2,3
Vitamine C	4,20
Vitamine B ₁	0,41
Vitamine B ₂	1,38
Vitamine B ₆	0,60
Vitamine B ₁₂	0,0008
Acide nicotinique	3,28
Acide folique	0,006

Source: FAO, (2002).

Le lait de chèvre est pauvre en carotène et en acide folique (B9) (AMIOT *et al.*,2002).

Le taux de caséine totale est un peu plus faible dans le lait de chèvre que dans le lait de vache. Il représente 75% de matière protéique contre et 78 % dans le lait de vache (GRICORDEAU, 1993 ; ABI AZAR, 2007 ; KEBCHAOU, 2013).

De plus l'équilibre entre les différentes fractions caséiniques est très différent et se caractérise par deux proportions 20 et 50 % de caséine Kappa et β alors qu'elle est de 13 et 34% dans le lait de vache (RICORDEAU, 1993 ; ABI AZAR, 2007 ; KEBCHAOU,2013). La taille moyenne des micelles du lait de chèvre est inférieure à celle du lait de vache (HENNANE, 2011).

1.1.5.6 / Les protéines

Le lait de chèvre est plus riche en protéines solubles que le lait de vache soit, 8.10% contre 6.0 %. La β - lactoglobuline est la protéine majeure du lactosérum du lait caprin.

Elle représente environ 55% soit plus de 4.4g/l de lait contre 25% pour le lait bovin (FAO,1998).

Tableau 4 : Composition moyenne en g/l et distribution des protéines dans le lait de chèvre.

Protéines	Concentration g/l
Total des protéines solubles (22%)	7,5
α lactalbumine	2,0
β lactoglobuline	4,4
Albumine sérique	0,6
Immunoglobulines	0,5
Total des caséines (71%)	24,3
Caséine α -S ₁	3,5
Caséine α -S ₂	4,8
Caséine κ	3,4
Caséine β	12,6
Azote non protéique (7%)	2,3
Protides totaux	34,1

Source: Jouan, (2002).

I.1.5.7 / Système enzymatique

Les enzymes sont des protéines globulaires spécifiques produites par des cellules vivantes (Jouan, 2002). Dans les conditions normales, le lait contient une grande variété d'enzymes. Il y a plus de 100 ans, la première enzyme fut découverte dans le lait de vache: la lactoperoxydase. Par ailleurs, le lait contient de nombreuses cellules étrangères (Leucocytes, microorganismes) élaborant aussi des enzymes, ce qui rend difficile la distinction entre éléments natifs et éléments extérieurs (Debry, 2001).

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases. Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température. En effet, chaque enzyme possède un pH et une température d'activité maximale (Vignola *et al.*, 2002). Le tableau 5 résume les principales classes d'enzymes du lait ainsi que leur pH et leur température d'activité maximale.

Tableau 5 : Caractéristiques des principaux enzymes du lait de chèvre.

Groupes d'enzymes	Classes d'enzymes	pH	Température (C°)	Substrats
Hydrolases	<i>Estérases :</i> lipases phosphatase alcaline phosphatase acide	8,5 9- 10 4- 5,2	37 37 37	Triglycérides Esters phosphoriques Esters phosphoriques
	<i>Protéases :</i> lysosyme plasmide	7,5 8	37 37	Parois cellulaires microbiennes Caséines.
Oxydases	Sulphydryle oxydase Xanthine oxydase	7 8,3	37 37	Protéines, peptides Bases puriques.
Oxygénases	Lactoperoxydase catalase	6,8 7	20 20	Composés réducteurs + H ₂ O ₂ H ₂ O ₂

Source: Vignola et al., (2002).

Ces enzymes sont donc des facteurs de dégradation des constituants originaux du lait. Elles induisent des modifications sur le plan technologique (**Visser, 1993**), et certaines jouent un rôle antibactérien et assurent une protection limite au lait (**Alais, 1984**).

1.1.5.8 /Substances antibactériennes

Le lait possède des propriétés bactéricides vis-à-vis de nombreux microorganismes de contamination (**Bourgeois et al., 1996**).

A / Lactoperoxydase-thiocynate

C'est une enzyme qui est présente dans tous les laits à une teneur de 30 mg/l (**Gautier et al., 1999**). Elle catalyse, en présence d'eau oxygénée, l'oxydation du thionate en donnant un système lactoperoxydase H₂O₂-thiocynase qui inhibe temporairement quelques streptocoques et tue d'autres (**Le Graet et Brule, 1993**).

B/ Les agglutinines

Ces immunoglobulines qui représentent 18,3 % des protéines du lait de chèvre, sont douées de propriétés antigéniques et sont capables d'agglutiner certaines souches de bactéries lactiques : streptocoques du groupe N (**Debry, 2001**).

C/ Lysozyme

Sa teneur dans le lait de chèvre est très faible. C'est une protéine basique stable à pH acide même à température relativement élevée (**Bergere, 1984**). Le lysozyme est important grâce à son rôle immunologique dans la conservation de la qualité du lait (**St-Gelais et Savoie, 1993**).

I.2. Microbiologie du lait de chèvre

Une grande majorité des articles médicaux sur le lait de chèvre est consacré à des infections, parfois graves, provoquées par l'utilisation du lait contaminé (**Bernnan et al., 2001**). Les infections peuvent être parasitaires ou plus souvent microbiennes. La raison la plus fréquente de cette contamination est liée à l'usage de lait cru (**Champagne et Moineau, 2003**).

On répartit les microorganismes du lait de chèvre, selon leur importance, en deux grandes classes : la flore originelle et la flore contaminant.

I. 2.1- Flore originelle

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptique, il devrait contenir moins de 5000 UFC / ml. La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces

microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs (**Champagne et al., 2000**).

Le lait qui sort du pis est pratiquement stérile. Les genres dominant de la flore originelle sont principalement des microorganismes utiles pour la transformation ultérieure du lait frais tel que *Lactobacillus* et *Streptococcus* (flore dite acidifiante ou lactique) (**Vignola et al., 2002**).

Le tableau 8 présente la liste des microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

Tableau 6: Flore originelle du lait cru.

Microorganismes	%
<i>Micrococcus</i>	20-60
<i>Lactobacillus</i>	20-40
<i>Streptococcus</i> et <i>Lactococcus</i>	< 20
Gram négatif	< 5

Source : **Vignola et al., (2002)**.

I. 2.2 -Flore contaminante

La flore contaminant est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération et/ou d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (**Guiraud, 1998**).

I.2.2.1/Flore d'altération

Les germes de l'environnement trouvent dans le lait un excellent milieu de culture (**Novel, 1993**).

La flore d'altération cause des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduit la vie de tablette du produit laitier.

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., les coliformes, soit principalement les genres *Echerichia* et *Enterobacter*, les sporulés telles que *Bacillus* sp. et certaines levures et moisissures (**St-Gelais et al., 1999**).

Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pas l'autre (**Vignola et al., 2002**).

I.2.2.2/ Flore pathogène

La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme (**Guiraud, 1998**).

Des études réalisées sur la flore microbienne du lait de chèvre ont mis en évidence la présence de *Staphylococcus aureus* dans 3 % de mammites (**Contreras et al, 1993**).

Les exigences réglementaires pour la protection de la santé publique imposent des normes sanitaires strictes vis-à-vis des trois pathogènes majeurs qui sont : *Brucella melitensis*, *Listeria*

monocytogenes et *Salmonella* sp. .Ces bactéries, si elles sont présentes dans le lait peuvent rendre les fromages insalubres en raison de leur pouvoir pathogène (**Guiraud, 1998**).

Le conditionnement du lait et la fabrication des produits laitiers nécessitent une bonne maîtrise des sources microbiennes à l'origine des dégradations et des défauts (**Vignola et al., 2002**).

I.3. Intérêt nutritionnel et diététique du lait de chèvre

Depuis des millénaires, on vantait les valeurs thérapeutiques du lait de chèvre. De nombreuses sources mentionnent en effet le traitement de troubles de nutrition des bébés, d'ulcères d'estomac, d'arthrite, d'eczéma et d'allergie (**Amiot, 2001**).

Le lait de chèvre est une source importante d'énergie, apportant près de 700 kcal / l. Une équipe de pédiatres (**Roy, 2003**) a montré qu'il était possible de réalimenter à l'aide de lait de chèvre, avec succès, des enfants manifestant une intolérance aux protéines bovines. D'autres travaux ont aboutis aux mêmes résultats (**Freud, 1996 ; Corthier, 2004**). Le lait de chèvre apparaît souvent comme substitut au lait de vache, notamment chez les enfants atteints de dermatite à topique (**Debry, 2001**).

La digestibilité des lipides du lait de chèvre est élevée (90 à 95 %), même chez l'enfant ayant une diminution de fonction pancréatique (**St-Gelais et al., 1999**).

Le lait de chèvre contient de nombreux constituants à des concentrations satisfaisantes pour couvrir certains besoins journaliers (acides gras, vitamines, minéraux....). Sa richesse en calcium et en phosphore contribue au maintien d'une bonne masse osseuse (**Desjeux, 1993**).

I.4. Propriétés médicinales

Le lait de chèvre est supposé porteur de vertus diététiques et thérapeutiques qui en font un produit de qualité. Il aurait une meilleure influence sur la prévention de l'ostéoporose et l'athérosclérose. Il préviendrait la prévention des inflammations des artères, et toutes les maladies dans lesquelles le stress oxydatif joue un rôle: inflammations, vieillissement, fertilité réduite chez l'homme, schizophrénie, cancer, maladies cardio-vasculaires. Les oligosaccharides dans le lait de chèvre protègent contre les bactéries pathogènes dans les intestins, et stimulent la croissance des bifido-bactéries dans le tractus gastro-intestinal (FRANK, 2003).

Il existe également un nombre important d'espèces quantitativement mineures, dont certaines jouent un rôle essentiel dans la protection du petit. C'est le cas des immunoglobulines, la lactoferrine, la lactoperoxydase (DORA, 2007).

I.4.1- Immunoglobulines

D'une grande hétérogénéité, les immunoglobulines constituent un groupe protéique complexe et diffèrent significativement des autres protéines sériques (EIGEL *et al*, 1984).

Sur les 5 classes d'immunoglobulines seules les IgG, IgA et IgM se retrouvent dans le lait caprin (PARK *et al*, 2007). La fonction protectrice de ces protéines, s'exprime à travers le lait d'une part par la protection des glandes mammaires et d'autre part par celle du nouveau-né (DE WIT, 1998 ; MARSHALL, 2004).

I. 4.2 – Lactoferrine

Métallo glycoprotéine fixatrice du fer (HURLEY *et al*, 1993 ; MARSHALL, 2004), la lactoferrine joue le rôle de promoteur dans l'absorption intestinale de celui-ci (HURLEY *et al*, 1993). De plus, du fait de son homologie avec la transferrine, elle est souvent qualifiée de lactotransferrine (VOJTECH *et al*, 2008). Vu ses propriétés bactériostatiques (SHUSTER *et HARMON*, 1990), par ferriprivation (MAYNARD *et al*, 1989), sa concentration dans le lait est un indice de résistance des glandes mammaires à l'implantation d'une infection bactérienne (SHUSTER *et HARMON*, 1990 ; RIBADEAU-DUMAS, 1991).

I. 4.3- Lactoperoxydase

Enzyme la plus abondante du lait (RIBADEAU-DUMAS *et GRAPPIN*, 1989), la lactoperoxydase est connue pour son caractère bactéricide du fait qu'elle est le catalyseur de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) du thiocyanate (SCN) donnant naissance à l'hypothiocyanate (OSCN-) (RIBADEAU-DUMAS *et GRAPPIN*, 1989; RIBADEAU-DUMAS, *et al*, 1991). L'hypothiocyanate est un puissant antibactérien. Du fait

de cette caractéristique bactéricide, la lactoperoxydase est utilisée comme agent protecteur du lait cru en particulier dans les régions tropicales (**RIBADEAU-DUMAS et GRAPPIN, 1989**).

I. 5. Technologie fermière du lait caprin

Traditionnellement, la production fermière de fromages à partir du lait de chèvre se base sur l'action des bactéries lactiques (**LEFRILEUX et al., 2009**). Ces dernières interviennent dans de nombreuses transformations du lait en crème maturée, en laits fermentés, en yaourts, en fromages frais et affinés (**DESMAZEAUD, 1998**). L'ensemencement est assuré par le repiquage du lactosérum issu de la fabrication précédente (technique de pieds de cuve) (**LEFRILEUX et al., 2009**). Le lait de chèvre est plus pauvre en caséines que le lait de vache. Son rendement fromager est par conséquent plus faible. Ce sont les spécificités de la composition de sa matière grasse qui donnent au fromage de chèvre son goût caractéristique. Le lactose, et surtout les l'équilibre minéral (Ca, P), facteurs de variations qui sont: la race et la conduite d'élevage (nutrition, reproduction, saisonnalité) sont à l'origine des particularités de ce lait (**ZELLER, 2005**). Même si un certain nombre de recherches ont permis de faire le point sur les facteurs alimentaires influant par exemple sur le taux butyreux (TB) ou le taux protéique (TP) du lait caprin, ainsi que leurs effets sur l'aptitude à la coagulation, le lien entre l'alimentation des animaux et la composition azotée et minérale du lait et des produits laitiers a fait l'objet de peu de travaux concernant cette espèce. A partir de données collectées dans des exploitations caprines, un lien entre l'alimentation des chèvres et le profil des courbes d'acidification en technologie lactique a été mis en évidence. La présence d'urée en excès dans le lait de cette espèce a été suspectée dans l'apparition de défauts de caillage en technologie lactique, ou dans un ralentissement de l'acidification en technologie pâte pressée non cuite (**LEFRILEUX et al., 2009**). Il existe deux procédés de fabrication du fromage de chèvre. Le plus répandu utilise des bactéries lactiques pour la coagulation. C'est un procédé naturel, lent qui donne un caillé friable et perméable. L'autre technique consiste à ajouter de la présure et on obtient assez rapidement un caillé ferme et imperméable (**ZELLER, 2005**).

I.6. Qualités du lait de chèvre

I.6.1- Qualité nutritionnelle

D'un point de vue énergétique, avec 710 contre 650 kcal/l pour le lait de vache, le lait de chèvre constitue une source importante d'énergie, expliquant ainsi de nombreuses observations de gain de poids chez l'enfant malade (DESJEUX, 1993 ; DE LA TORRE *et al.*,2008). De plus, celui-ci est d'une biodisponibilité supérieure au lait de vache (HOSSAINI- HILLALI, 1995).

La fraction lipidique du lait caprin est pauvre en acides gras polyinsaturés nécessaires au métabolisme humain, mais riches en acides gras à chaînes courtes et moyennes (C4 à C 10) favorisant la digestibilité (**RAZAFINDRAKOTO *et al.*,1993;MAHE,1997 ; BARRIONUEVO *et al.*, 2001**). Cette dernière est importante pour les protéines du lait de chèvre et dépasse celles du lait de vache (**RAMOS *et al.*, 2005 ; HEINLEIN *et CACCESE,2006***).

I. 6.2 - Qualité microbiologique

D'un point de vue microbiologique, la majorité des espèces de bactéries lactiques sont présentes dans le lait cru de chèvre. Le lait ovin et caprin constitue néanmoins un danger en tant que vecteur potentiel de la brucellose (**DUMOULIN *et PERETZ, 1993***).

Les mammites sont les troubles sanitaires les plus fréquentes en élevage laitier. Ce sont des infections microbiennes de la mamelle, à l'origine d'une forte augmentation de la concentration en cellules somatiques (C C S) du lait (MORGAN, 1999 ; COULON *et al.*,2005). Pour le lait caprin, ces mammites sont sujettes à des variations saisonnières, avec de faibles concentrations en avril et de fortes concentrations en cellules somatiques en septembre (**DROKE *et al.*, 1992 ; GUILHERME *et al.*, 2009**).

Toutefois, le contenu en cellules somatiques d'un lait prélevé sur une chèvre saine est nettement plus important que celui provenant d'une vache saine (**SANCHEZ *et al.*, 2005**).

En plus de l'impact sur la qualité microbiologique du lait, l'augmentation du nombre de cellules somatique dans celui-ci modifie la composition physico-chimique (**JYOTI *et al.*,1988 ; CEBO *et Al* 2009**).

C'est ainsi qu'on note une diminution du pH, des teneurs en lactose et en caséines, une augmentation de la lipolyse et une forte variation des équilibres salins (**BALLOU *et al.*, 1995 ; LEITNER *et al.*, 2004 ; PULINA *et al.*, 2008**).

I.6.3- Activité lipolytique

La lipolyse, dégradation enzymatique de la matière grasse du lait, conduit à la libération d'acides gras libres, ayant pour conséquence le développement de la flaveur particulière type "chèvre " mais peut aussi engendrer des défauts de flaveur à des niveaux de lipolyse trop élevées (**LAURET, 2002a**).

La lipolyse peut être induite et accentuée par des traitements mécaniques ou thermiques lors de la traite ou de la manipulation des laits (**MORGAN *et al*, 2001 ; LAURET, 2002a ; DEHARENG *et al*, 2004**). Ces facteurs permettent aux lipases d'avoir un plus large accès aux triglycérides après que la membrane du globule gras assurant la dispersion de la matière grasse du lait ait été endommagée (**CHILLIARD et LAMBERET, 1984 ; DANTHINE, 2000**).

Le lait de chèvre, comme le lait de vache contient une lipase native possédant les caractéristiques d'une lipoprotéine lipase (LPL) (**LE JAOUEN *et al*, 1990**), thermolabile (**KUZDZAL-SAVOIE, 1975**) et n'agissant que très faiblement sur les triglycérides à courte chaîne (**CHILLIARD et LAMBERET, 1984**).

II.1. Définition

La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par **Lister en 1873 (Ho, 2008)**. Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (**Metchnikoff, 1908; Sandine et al., 1972; et Carr et al., 2002**). Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**De Roissart, 1986**).

II.2. Caractéristique principales des bactéries lactique

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par **Orla-Jensen (1919)** et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel G., 1993**).

Les bactéries lactiques formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (**Badis et al., 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (**Salminen et al., 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011**).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004**). En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (**Prescott et al., 1999**). Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide

lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose
- hétérofermentaires facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique
- hétérofermentaires strict : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂

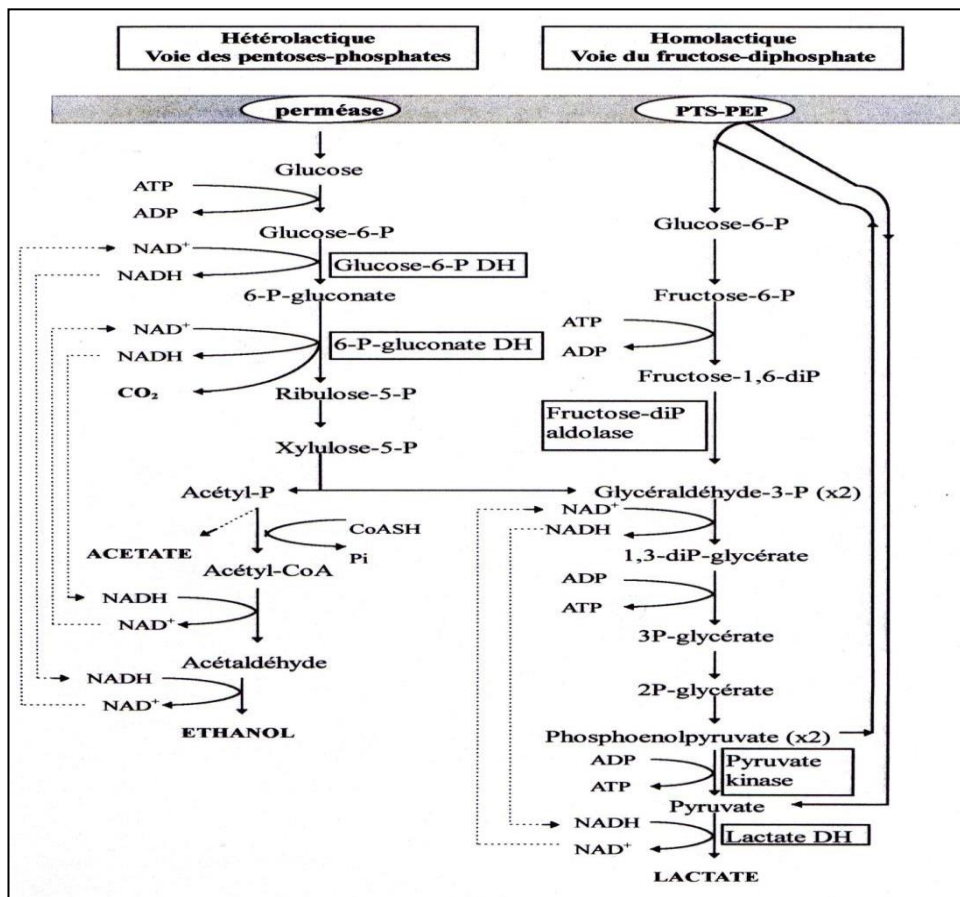


Figure 2: Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et De Roissart, 1994).

II.3. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni et al., 2001). D'autres études montrent que certaines

bactéries lactiques, comme *Lactobacillus lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (Duwat *et al.*, 2001).

II.4. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (Mayo *et al.*, 2010 ; Klein *et al.*, 1998) Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (de Roissart, 1986).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis sub sp. Lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Sandine, 1988).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (Jones, 1978).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (Suhigara, 1985) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Devoyod et Poullain, 1988).

Boubekri et Yoshiyuki (1996) ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. à partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie). Tandis que, **Ryhänen *et al.* (1996)** ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides subsp. Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté. Seule l'espèce *Leuconostoc oenos* est isolée du vin (Fleming *et al.*, 1985 ; Sugihara, 1985 ; Devoyod et Poullain, 1988 ; Hounhoïgan *et al.*, 1993).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja) (Chapman et Sharpe, 1981; Dellaglio *et al.*, 1981A ; Uchida, 1982; Bacus et Brown, 1985 ; Villar *et al.*, 1985).

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).

II. 5. Classification des bactéries lactiques

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen.

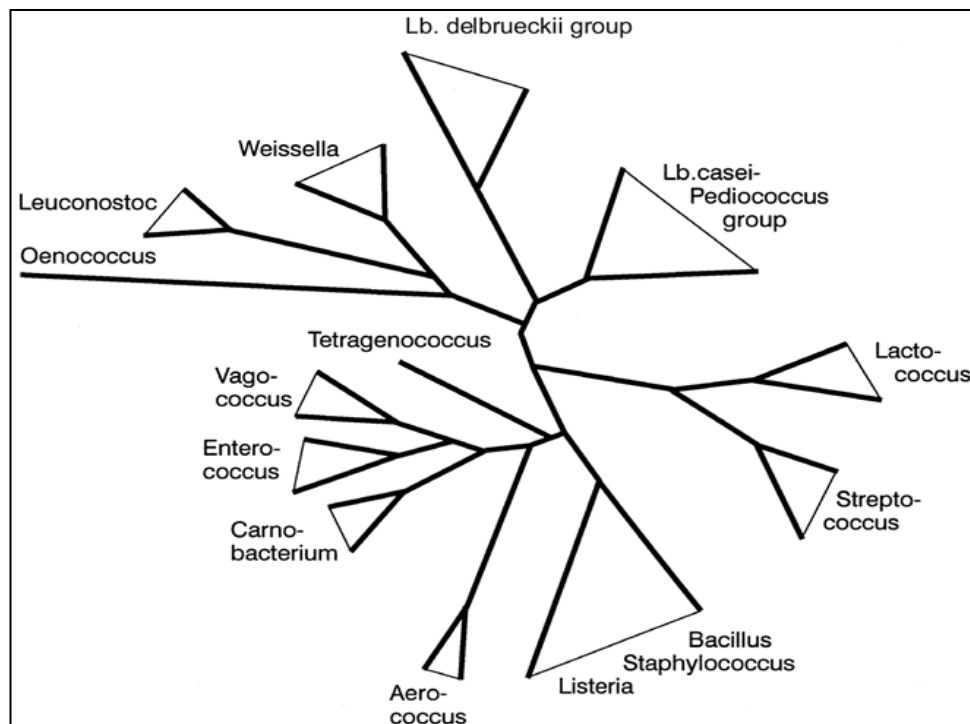


Figure 3 : Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparentés (Axelsson, 2004)

D'après Ludwig *et al.* (2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes:

Bacilli, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro- intestinal (Klein *et al.*, 1998).

5.1 - Les différents genres

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres qui incluent *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

5.1.1/ *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile.

L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en **G + C** qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet M-F. *et al.*, 2005)

La classification remaniée par Kandler et Weiss (1986) les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire

groupe **I** : anciennement appelé *Thermobacterium*. Il regroupe les lactobacilles

homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof, éproduisant

exclusivement de l'acide lactique, elles se développent à 45°C mais pas à 15°C. Leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades (**Bottazzi, 1988**).

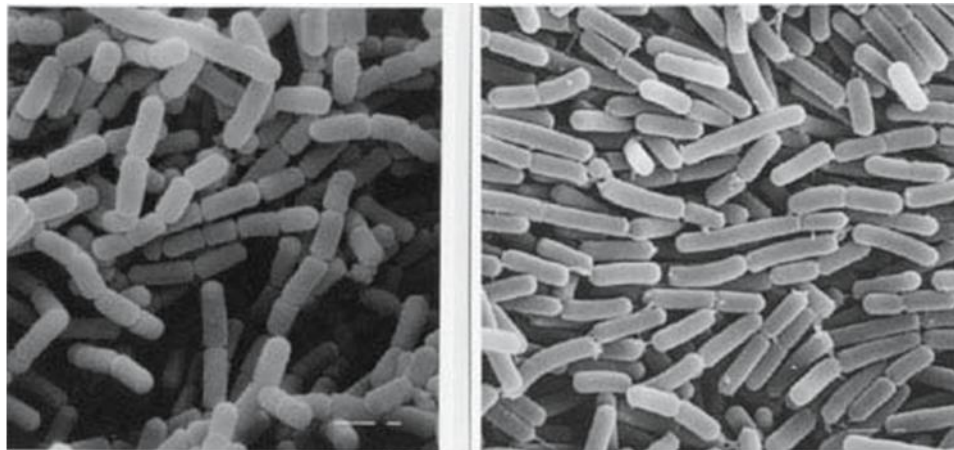
groupe **II** : anciennement appelé Streptobacterium. rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (mais pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate), celle des pentoses et du gluconate peuvent être dégradés par la voie hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphokétolase inductible. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments (**Bottazzi, 1988**).

groupe **III** : anciennement appelé Betabacterium. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO₂, celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. ces bactéries possèdent une phosphokétolase (tableau 7). c'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. les cellules sont courtes, droites et séparées (Bottazzi, 1988).

Tableaux 7 : Critères différentiels des trois groupes de Lactobacilles (**Sharpe, 1981; Kandler et Weiss, 1986**)

Caractéristiques	Group I, homofermentaires Obligatoires	Group II, hétérofermentaires Facultatifs	Group III, hétérofermentaires Obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

Les Lactobacilles, de par leur variété, sont présents dans des milieux très différents (NovelG.,1993) : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, lait et produits laitiers (différents type de fromages), produits carnés, poissons marinés ou fumes.



A)

B)

Figure 4: Morphologie de **A:** *Lactobacillus casei* and **B:** *Lactobacillus acidophilus*

(Examen en microscopie électronique, ×7000)

Photo Bottazzi Vittorio

5.1.2 / *Carnobacterium*

Ce genre a été créé par Collins *et al.* (1987). Sont des bacilles hétérofermentaires souvent trouvés dans les viandes de bœuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température (Novel G., 1993; Joffraud *et al.*, 2006). ils ont originellement décrit comme *Lactobacillus mobile*, *Lb. gallinarum*, *Lb. divergens*, *Lb. piscicola* (Novel G., 1993). Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*.

Morphologiquement proche des *Lactobacillus* (petits batonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes), ils s'en différencient par leur production de l'acide lactique L(+) et leur incapacité à se développer dans les substrats à base d'acétate. En général, les *Carnobacterium* peuvent

croître à un pH relativement élevé (par exemple, pH=9) tandis que les lactobacilles ne peuvent pas s'y développer (Schillinger et Lücke, 1987). La croissance est possible à 0°C et 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de NaCl 8% (Larpent J-P., 1996a). Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% (**Dellaglio *et al.*, 1994**).

Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés, ou de produits de la mer, saumon fumé mais certains ont également été isolés de fromages.

5.1.3 / *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus et Vagococcus*

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus* (Axelsson, 2004). Ce sont des coques en paire ou en chaîne, leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acide L-lactique.

Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield.

- Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques. ces organismes ont un contenu en G+C de 35 à 46% (Pilet M-F. *et al.*, 2005). Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes, hémolytiques (hémolyse β) comme *Streptococcus pyogenes* ; d'autres streptocoques oraux (α - ou non-hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*).

L'espèce thermophile qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » par Scheilfer et Kilpper-Bälz (1987). Du fait par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques.

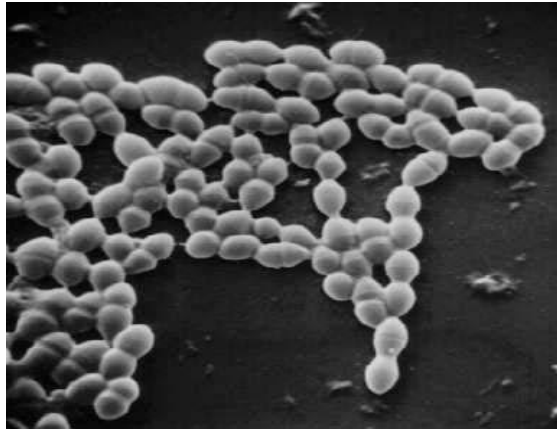


Figure 5 : Morphologie en microscopie électronique de *Streptococcus thermophilus* (Liebefeld, 2002).

Le genre *Lactococcus* appartient au groupe N de Lancefield, représente les streptocoques dits « lactiques ». Récemment Schleifer *et al.* (1985), se fondant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (Novel G., 1993).

Les lactocoques sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière. Trois sous-espèces de *La. lactis* peuvent être distinguées : *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *hordniae*. Seules les deux premières interviennent dans la plupart des produits laitiers.

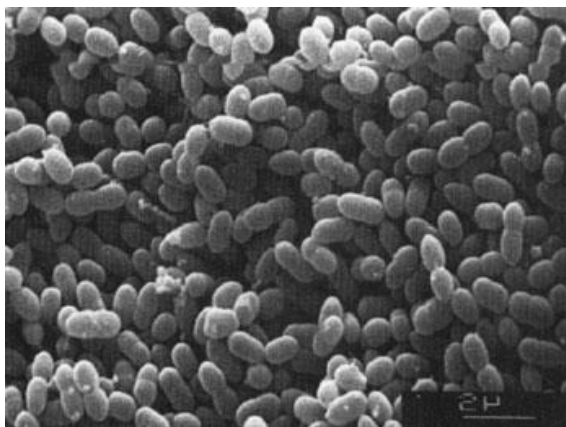


Figure 6: Morphologie en microscopie électronique de *Lactococcus lactis* subsp. “*diacetylactis*” (Teuber et Geis, 2006)

- Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type λ , β , et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 % NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés (*En. durans* et *En. bovis*).

Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produit végétaux, sol, produits laitiers (Giraffa *et al.*, 1997). Les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages.

- Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras (Ho, 2008).

5.1.4 / *Leuconostoc, Oenococcus et Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide D(-) lactique.

- Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878. Ce genre a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leurs contenus G+C sont assez voisins (37 à 45%) (Garvie, 1986). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas

hémolytiques ni pathogènes. ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de diacétyle et parfois par la synthèse de dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (Novel G., 1993).

Les études phylogénétiques des *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre (Eom *et al.*, 2007).

En général les *Leuconostocs* sont utiles dans différents types de fromages (Devoyod et Poullain, 1988 ; Ogier *et al.*, 2008) où ils facilitent l'«ouverture» par la production

de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute, etc) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

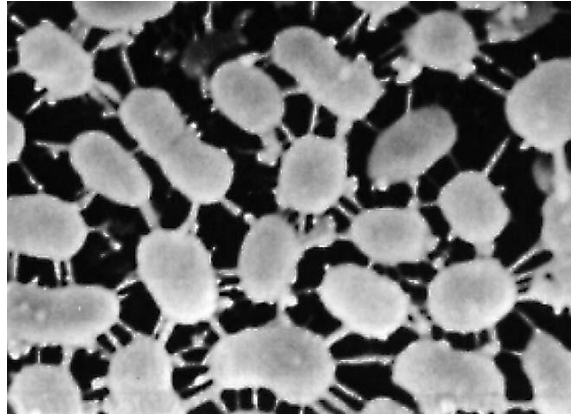


Figure 7 : Fixation des Leuconostocs sur les moules en grès-vernissé.

(Examen en microscopie électronique de balayage, 11 500×).

Photo Micheline Rousseau - Christiane Le Gallo

INRA - C.R. Jouy-en-Josas

- L'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été renommée *Oenococcus oeni* et certains lactobacilles hétérofermentaires ont été groupés avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

5.1.5 / *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles, homofermentaires, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose.

- Sept espèces de *Pediococcus* sont connues: *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicum*, *P. inopinatus*, *P. parvutus*, *P. pentosaceus* et *P. urinaeequi*. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+) et sont aussi caractérisés par le GC% de leur ADN (34-42%). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire

tant sous l'aspect négatif que positif. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P. damnosus*). Les *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez *et al.*, 2007 ; Gurira *et al.*, 2005).

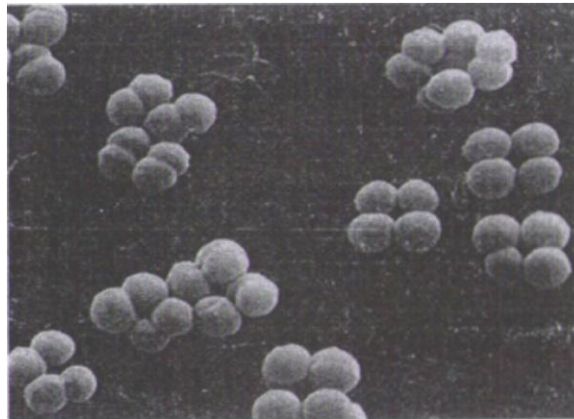


Figure 8 : Morphologie en microscopie électronique de *Pediococcus* sp.

Photo Sylviane Lemarinier (Université de Caen)

- L'espèce *Pediococcus halophilus* a été renommée *Tetragenococcus halophilus*. Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *T. halophilus* et *T. muriaticus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18 % NaCl). Ils ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires comme les saumures (anchois salés), les sauces de soja, etc.

- Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire (Axelsson, 2004).

5.1.6 / *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*), la forme des cellules de *Bifidobacterium* est très irrégulière, pouvant être: cellules courtes, conoïdales, cellules ramifiées, spatulées, isolées ou en chaîne, disposées en V ou en palissade (Larpent J-P., 1996a ; Pilet M-F. *et al.*, 2005).

Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur contenu G+C (55-67%) et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphocétolase). En fait

Bifidobacterium permet de fermenter les hexoses en produisant plus d'acide acétique que d'acide lactique (rapport 3:2), de faibles quantités d'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques (Pilet M-F. *et al.*, 2005). Leur température de croissance est comprise entre 37°C et 41°C.

Ils sont isolés à partir de la flore intestinale du nouveau-né, on les retrouve aussi dans l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. Ils sont utilisés dans la fabrication du yaourt et produits laitiers fermentés (probiotiques).

Leur présence entraînerait une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal grâce à la présence d'un facteur bifidogène (Sondergaard, 2005).

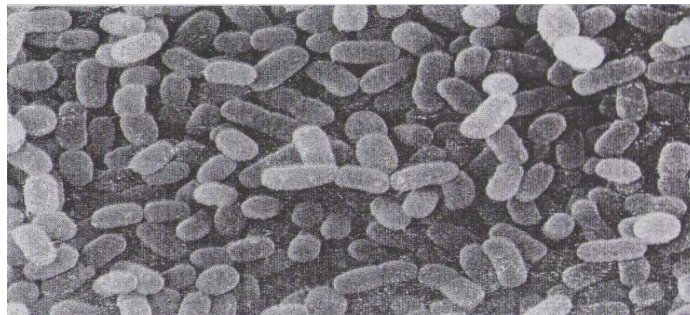


Figure 9 : Morphologie en microscopie électronique de *Bifidobacterium animalis*.

Photo Sylviane Lemarinier (Université de Caen)

II. 6. Applications

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle. Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Daly *et al.*, 1998 ; Hugenholtz *et al.*, 2002). La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (Mayra-Makinem et Bigret, 1998). Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Wisselink *et al.*, 2002). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (Rodriguez *et al.*, 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (**Langella *et al.*, 2001**).

II.7. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées

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

II. 7.1- Activité acidifiante

La transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (**Frank et Hassan, 1998 ; Mayra-Makien et Bigret, 1998**).

II. 7.2- Production de métabolites d'intérêt

Selon les espèces et selon les souches, les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites tels que l'acide acétique, l'éthanol, des arômes (diacétyl, acétaldéhyde...), des bactériocines (activité antimicrobienne), des exo polysaccharides, des enzymes (protéases, peptidases, lipases...) et du CO₂ (formation d'ouvertures dans les fromages) (Beal *et al.*, 2008 ; Frank et Hasssan, 1998 ; Mayra-Makien et Bigret, 1998) .

II. 7.3- Propriétés enzymatiques

Les activités protéolytiques et peptidasique sont importantes car elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu. L'activité lypolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (Beal *et al.*, 2008).

II. 7.4- Propriétés spécifiques aux probiotiques

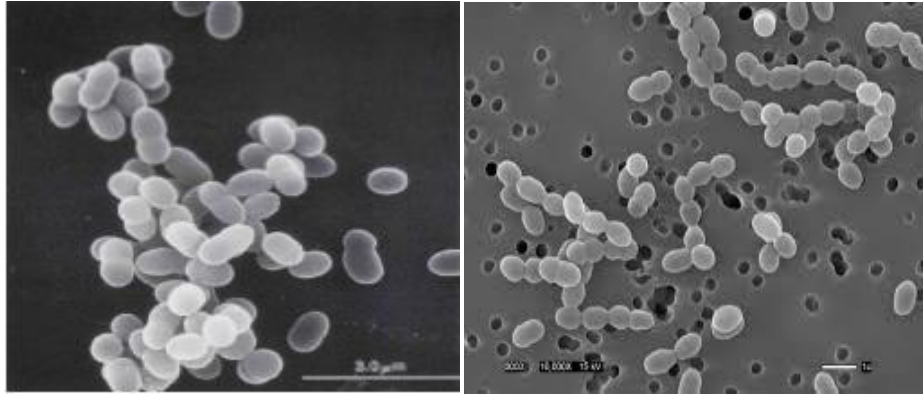
En plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (Da Cruz *et al.*, 2007 ; Ouwehand *et al.*, 2002). De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche, principalement en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques.

II. 7.5- Critères de performance

Indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité, éthanol, chlorure de sodium) (Beal *et al.*, 2008).

III-1. Genre *lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de 0,5 à 1 µm de diamètre formant des chaînes de longueur variable



A)

B)

Figure 10 : *Lactococcus lactis* sub sp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (A), et en chaînette (B) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits

« Lactique ». Car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires ne possèdent aucun caractère pathogène.

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires produisant exclusivement de l'acide L (+) lactique. Seule *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Dans certaines conditions cependant, ces bactéries peuvent présenter un métabolisme diversifié, appelé métabolisme mixte, au cours duquel des quantités importantes de formiate, d'acétate et d'éthanol sont produites. Les produits du métabolisme mixte sont pourtant plus inhibiteurs que le lactate. Le métabolisme mixte a d'abord été observé par Thomas (1995) lors de cultures de *L. lactis* en mode continu.

Les espèces du genre lactocoques se distinguent par la présence dans leur enveloppe d'antigène du groupe N par leur caractère faiblement hémolytique mais non pathogène pour la

plupart par leur température de croissance minimale inférieure à 10°C et optimale voisine de 30°C par leur thermo-sensibilité et leur inaptitude à croître en présence de 6.5% de NaCl et à pH=9.6 (Schleifer *et al.*, 1985).

Les habitats les plus importants de *Lactococcus* demeurent le lait, les laits fermentés et les fromages où on les trouve en quantité dominante, utilisés en culture pures ou en association avec d'autres micro-organismes, ils jouent dans les produits laitiers fermentés un rôle irremplaçable pour y assurer la structure le goût, la conservation et la salubrité.

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces. Les trois espèces suivantes sont utilisées dans l'industrie laitière : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Teuber *et al.*, 1995). Ces sous-espèces se différencient selon certains caractères biochimiques, telle la production de diacétyl à partir du citrate, la désamination de l'arginine, la capacité à croître en présence de 4.5% de sel, à pH 9,2 et à 40° C.

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* et *Lc. lactis* subsp. *hordniae* (Pot, 2008). Même si *L. lactis* se sous-divise en quatre sous-espèces, soit *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. lactis* ssp.

lactis et *L. lactis* subsp. *tractae* ssp. nov. (Perez *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2002; Schleifer *et al.*, 1985), seulement *L. lactis* subsp. *cremoris* et subsp. *lactis* peuvent être isolées de l'environnement laitier et sont couramment utilisées pour la fabrication de babeurre, de crème sûre et de fromage. Des études récentes ont démontré que la sous-espèce *L. lactis* ssp. *lactis* pouvaient aussi être isolée des végétaux (Siezen *et al.*, 2007), de l'appareil uro-génital féminin (Gao *et al.*, 2011) et du système gastro-intestinal de certains poissons d'eau douce et du mucus intestinal de la truite brune (*Salmo trutta*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Perez *et al.*, 2011). ces quatre sous-espèces peuvent facilement être différenciées sur la base de plusieurs caractéristiques phénotypiques (e.g. croissance en présence de 4 % de NaCl, utilisation de différents sucres, sensibilité à divers antibiotiques) (Perez *et al.*, 2011; Schleifer *et al.*, 1985).

Les deux sous espèces de *Lc. lactis* : *Lc.lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* se distinguent essentiellement par leur capacité acidifiante et leur sensibilité à la température. La sous- espèce *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est incapable de pousser au- dessus de 37°C. Le biovar *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, utilise le citrate, produit du diacétyl, de l'acétoïne et du CO₂ (Chamba, 2000).

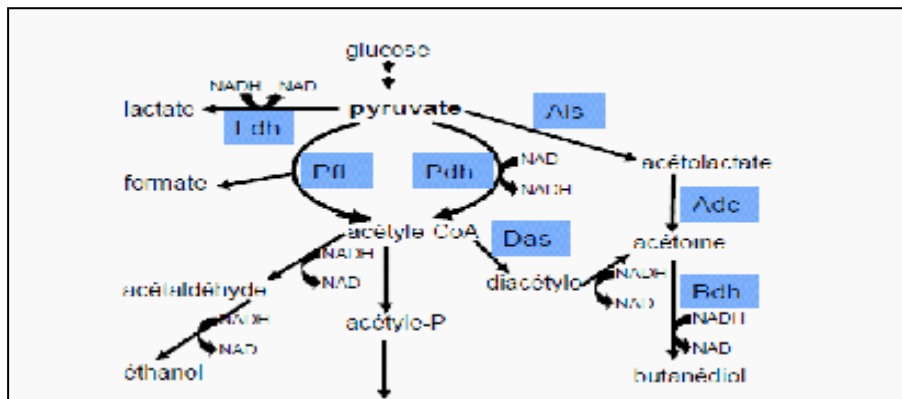


Figure 11 : Métabolisme du pyruvate chez *L. lactis*.

Ldh : lactate déshydrogénase, Pdh : pyruvate déshydrogénase, Pfl : pyruvate-formate-lyase, Als : acétolactate synthase, Adc : acétolactate décarboxylase, Bdh : butanédiol déshydrogénase, Das : diacétyl synthase. (Christel Garrigues *et al.*, 1998).

Tableau 8: Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994).

Espèces	Croissance dans / à :					Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de :			Voges-Proskauer
	Nacl 2%	Nacl 4%	10°C	40°C	45°C			Arginine dihydroclae	α galactosidas	β galactosidas	
<i>Lc. garviae</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.cremoris</i>	+	-	+	-	-	-	L(+)	-	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.hordnae</i>	+	-	+	-		-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	v
<i>Lc.plantarum</i>		+	+	v	-	-	L(+)	-	v	-	+
<i>Lc.raffinolactis</i>		-	+	-		-	L(+)	v	+	-	+

Tableau 9 : caractéristiques physiologique et biochimique du genre *lactococcus*(de roissart. et luquet., 1994).

ESPECES	Mobilité	Pigmentation jaune	Croissance dans/à							Gaz à partir du glucose	Hydrolyse de :			
			NaCl 3%	NaCl 4%	NaCl 6,5%	pH 5,6	10°C	40°C	45°C		Gélatine	Esculine	Hippurate	
<i>Lc.garvieae</i>	-	-		+			+		+	-			+	V
<i>Lc.lactis ssp. Cremoris</i>	-	-	+	-			+		+	-	-		V	+
<i>Lc.lactis ssp.hordniae</i>	-	-	+	-						-	-		+	-
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>	-	-		+			+	+		-	-		+	+
<i>Lc.piscium</i>	-	-					+			-	-		+	
<i>Lc.plantarum</i>	-	-		+			+		V		-		+	-
<i>Lc.raffinolactis</i>	-	-		-						-	-		+	-

Tableau 10: Profil fermentaire du genre *Lactococcus* (De Roissart et Luquet, 1994).et Luquet,1994).

ESPECES	Production d'acide par fermentation de :									
	amygdaline	L-arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Saccharose	D-Xylose
<i>Lc.garvieae</i>	+	-	+		+	+	V	V	V	-
<i>Lc.lactis ssp. Cremoris</i>	-	-	+		+	+	-	V	V	V
<i>Lc.lactis ssp.hordniae</i>	-	-	+		-	-	-	V	+	V
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>	V	-	+		+	+	+	V	V	V
<i>Lc.piscium</i>	+	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Lc.plantarum</i>	+	-	+		-	-	+	+	+	-
<i>Lc.raffinolactis</i>	V	V			+	+	+	V	+	+

III-2. Habitat et rôle

Le terme « habitat » signifie le milieu naturel ou vit un organisme. Dans un habitat, on distingue les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques qui déterminent les réactions, les adaptations physiologiques et parfois même morphologiques de l'organisme et qui a l'inverse se modifie par la présence de l'organisme. « Les facteurs abiotiques » considérés

généralement comme le milieu, sont de nature physicochimique : la lumière, la température le pH la disponibilité de l'eau, la teneur en nutriment en oxygène etc. « Les facteurs biotiques » sont déterminés par la présence d'autres organismes de même espèce ou d'espèces différentes, qui exerce une complémentarité ou une concurrence en modifiant les facteurs abiotiques, par l'utilisation ou la transformation des substrats, la production de substrats stimulants ou de substrats inhibitrices.

Les caractéristiques métaboliques d'un micro-organisme jouent un rôle important dans le choix de son habitat, on peut en définir un ou plusieurs, pour chaque espèce bactérienne qui occupe en général qu'un seul habitat par écosystèmes. Mais il peut arriver que des bactéries appartiennent à la même espèce se trouvant dans plusieurs habitats.

Rappelons qu'un écosystème est un système biologique complexe, formé de divers organismes vivant ensemble (biocénose) dans un milieu donné (biotope), et constitué par conséquent un fragment de la biosphère.

Les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physicochimiques et biologique dans certains écosystèmes, elles sont dominantes, dans d'autres elles sont minoritaires, mais capables d'exercer des effets bénéfiques ou plus rarement des altérations biologiques (Dellaglio *et al.* 1994) en plus leurs grandes exigences nutritionnelles les associent à des environnements naturels particulièrement riches (végétaux, produits laitiers et carnés).

Les représentants du genre *Lactococcus* sont les bactéries lactiques les plus importantes d'un point de vue commercial, sont principalement isolées des végétaux et de la peau des animaux. Les lactocoques se trouvent en grande quantité dans le lait cru et une large gamme de produits laitiers tels que le beurre et les laits fermentés, et de nombreuses variétés de fromages (soit parce qu'ils y ont été ajoutés comme levains, soit parce que les Produits laitiers ont été fabriqués à partir de lait cru à des températures favorables au Développement des lactocoques. Les végétaux sont le réservoir naturel des lactocoques laitiers. Ces derniers sont utilisés depuis longtemps dans les levains ont perdu certains phénotypes et acquis d'autres phénotypes suite à la domestication de lactocoques issus de végétaux (Bachmann *et al.*, 2012).

Les lactocoques isolés de végétaux ont par la capacité à fermenter une plus large variété de glucides et à produire plus de composés d'arôme, une autotrophie pour un nombre d'acides aminés supérieur, et une plus forte tolérance aux stress (Nomura *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2007).

Tableau 11: Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des Exploitations agricoles (*Teuber et Geis, 2006*).

Sample	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	New, undefined <i>Lactococcus</i> sp.
Cheese plant					
- cheese milk	+	+			
- cheese whey	+	+			
- waste whey	+	+	(+)		
- wastewater tank	+	+	+	+	+
- wastewater disposal site soil	(+)	(+)		(+)	
- grass	(+)	(+)	(+)	(+)	
Farm samples					
- raw milk	+	+	+	+	+
- milk machine	+	+			
- udder	+	+			
- Saliva, cow	(+)	(+)			
- Saliva, bull	(+)				
- skin, cow	(+)		(+)		
- skin, bull	(+)		(+)		
- grass		(+)		(+)	
- soil	(+)		(+)	(+)	
- silage	(+)				

+ = detected by direct plating; (+) = detected by plating after enrichment.

Tableau 12: Les lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers (*Teuber et Geis, 2006*).

Sample	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	New, undefined <i>Lactococcus</i> sp.
Cheese plant					
- cheese milk	+	+			
- cheese whey	+	+			
- waste whey	+	+	(+)		
- wastewater tank	+	+	+	+	+
- wastewater disposal site soil	(+)	(+)		(+)	
- grass	(+)	(+)	(+)	(+)	
Farm samples					
- raw milk	+	+	+	+	+
- milk machine	+	+			
- udder	+	+			
- Saliva, cow	(+)	(+)			
- Saliva, bull	(+)				
- skin, cow	(+)		(+)		
- skin, bull	(+)		(+)		
- grass		(+)		(+)	
- soil	(+)		(+)	(+)	
- silage	(+)				

+ = detected by direct plating; (+) = detected by plating after enrichment.

III-3. Métabolisme azotés chez les lactococcus

III-3.1. Besoins azotés

Les bactéries lactiques, ont des besoins nutritionnels complexes, notamment en ce qui concerne les fractions azotées du lait, car elles sont incapables d'effectuer la synthèse totale des acides aminés à partir d'une source azotée plus simple. Dans le lait, elles peuvent disposer

de composer de bas point moléculaire et des protéines, caséine notamment (Desmazeaud, 1996).

Dans études systématiques, portant sur les besoins azotés en acides aminés, ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus*. Ces études sont fondées sur la technique d'omission individuelle de chacun des éléments du milieu (Reiter et Oram, 1962), pour déterminer les auxotrophies de plusieurs souches de *Lactococcus lactis*. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées, possèdent au moins des auxotrophies pour le glutamate, la valine, la leucine, l'isoleucine la méthionine et l'histidine.

L'étude de la détermination des exigences nutritionnelles de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* montre que la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL 1403 isolée d'un milieu laitier était auxotrophe pour neuf acides aminés et cinq vitamines. En revanche, la souche NCDO 2118 isolée d'un milieu végétal est, d'après la technique d'omission individuelle, prototrophe vis-à-vis des acides aminés, mais exige pourtant six acides aminés et cinq vitamines pour sa croissance. À partir du milieu minimum contenant ces six acides aminés, la suppression du glutamate provoque un temps de latence d'environ 48 h avant le début de la croissance, et une diminution de moitié du taux. Ces résultats indiquent que le problème de biosynthèse est restreint à la fabrication du glutamate. Le temps de latence considérable nécessaire pour la synthèse du glutamate s'est avéré être reproductible et observé aussi bien sur milieu complet que sur milieu minimum (Loubière *et al.*, 1997).

La définition donc de prototrophie/auxotrophie est en partie dépendante de la composition du milieu de culture.

III-4. *Lactococcus* et les conditions de croissance

Les bactéries lactiques, et en particulier *Lactococcus lactis*, jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits.

La croissance des bactéries en général, et de *Lactococcus lactis* en particulier, dépend des conditions nutritionnelles (sources de carbone et d'azote.) et physico-chimiques (pH, Température, salinité.).

Les conditions de culture en laboratoire sont souvent optimisées et Contrôlées pour assurer une croissance rapide. A l'inverse, *Lactococcus lactis* dans son habitat naturel (plantes, sol) ou lors de sa mise en oeuvre dans les processus Industriels, doit faire face à de multiples stress nutritionnels ou physico-chimiques (Thermique, oxydatif, acide, osmotique) parfois concomitants (Bunthof *et al.*, 1999 ; Sanders *et al.*, 1999 ; Stuart *et al.*, 1999).

En effet, *L. lactis* est soumis à de fortes variations de températures dans le sol ou lors de la fabrication de fromages tels que le cheddar, pour lequel la température monte jusqu'à 40°C. A l'inverse, la température est beaucoup plus faible pendant l'affinage (8-16°C) ou le stockage du fromage. De même, la production de lactate dans les levains provoque, quant à elle, une acidification croissante du milieu (lait). Dans ce cas, les bactéries sont elles-mêmes à l'origine du stress acide. La pression osmotique est également susceptible de varier significativement, notamment lors du pressage. Cette étape peut également conduire à une limitation carbonée par l'élimination du lactose dans le Lactosérum (Stuart *et al.*, 1999).

Les mécanismes de perception du stress, essentiels pour que la cellule puisse se protéger avant que les effets de ce stress ne soient irréversibles, sont encore peu connus chez *Lactococcus lactis* mais semblent se faire chez les autres bactéries, soit au niveau membranaire, soit au niveau du cytoplasme (Rallu, 1999).

III-5. Rôle de *Lactococcus lactis* dans la fabrication du fromage

Lactococcus lactis est la seule espèce de lactocoques utilisée industriellement en fromagerie, Le groupe des levains mésophiles, auquel les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait, à travers leur métabolisme homofermentaire, et à produire des arômes. Les lactocoques sont utilisés dans la majorité des technologies fromagères où ils peuvent constituer le seul ensemencement en bactéries lactiques (Chamba ,2000).

La fabrication d'un fromage résulte d'un ensemble de phénomènes physico-chimiques et biochimiques de transformation du lait par une flore microbienne et/ou par l'action de présure. Les levains lactiques sont capables de fermenter les sucres en lactate entraînant la coagulation du lait, mais également de produire de nombreux autres composés comme des polysaccharides, des arômes ou encore des agents antibactériens (bactériocines). Ainsi, les fonctions technologiques résultant de l'action de ces micro-organismes touchent aussi bien la texture que les aspects organoleptiques, nutritionnels et sanitaires du produit fini, ainsi que sa conservation (Raynaud, 2006).

III-6. Les milieux de cultures d'isolement et d'identification des bactéries lactiques dans le lait

Les bactéries lactiques sont présentes dans le lait cru, les produits laitiers tels que les fromages, les yaourts et le lait fermenté.

Ces bactéries lactiques ont un effet probiotique et un intérêt technologique ou médical, elles sont réputées pour avoir de nombreuses et complexes exigences nutritionnelles qui rendent parfois leurs cultures fastidieuses en laboratoire.

L'isolement, le comptage et la caractérisation parfaite de ces bactéries sont nécessaires.

De nos jours, il existe plusieurs milieux sélectifs pour isoler les bactéries lactiques. Des outils sont également disponibles pour les caractériser au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche.

Les milieux sélectifs ont une implication dans la favorisation de développement d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (tel que les milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Leur composition la composition d'un milieu de culture adéquat doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend :

- Des substrats nutritifs: acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres,
- Un système tampon assurant la Constance du pH,
- Des sels minéraux,
- Des vitamines,
- D'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes: protéines, acides aminé, vitamines supplémentaires.

III- 6.1. Le lait milieu de culture

Contrairement à ce que l'on pourrait supposer, le lait n'est pas un milieu de culture optimum pour les bactéries lactiques. Par exemple une simple addition d'extrait de levure stimule leur production d'acide lactique .Julliard *et al* . (1995) en étudiant la croissance de *Lc .lactis* subsp.*cremoris* E8 et AM2 dans le lait ont obtenu, en fin de croissance, une densité cellulaire de l'ordre de 3.10^7 soit 50 fois plus faible que celle normalement atteinte dans un milieu synthétique ; d'autre part, on constate depuis longtemps, des variation journalières ou saisonnières importantes dans l'activité des ferment lactiques cultivés dans le lait , indépendamment des caractéristiques des souches et de toute action inhibitrice due aux

bactériophages ou aux antibiotiques. Les variations sont généralement attribuables à des différences d'aptitude du lait au développement des bactéries lactiques qui sont particulièrement exigeantes du point de vue nutritionnel.

III-6.2. Milieux pour lactocoques

Deux milieux de culture sont généralement utilisés pour faire pousser en laboratoire les lactocoques. Il s'agit des milieux Elliker (Elliker *et al.*, 1956) et M17 (Terzaghi & Sandine, 1975).

Le premier sert à isoler et à énumérer les lactocoques, tandis que le deuxième sert plutôt à faire croître ces derniers. Dans les dernières années, le milieu M17 est devenu un standard dans les études génétiques des lactocoques (Teuber, 1995). Le milieu M17 contient habituellement les ingrédients suivants : digestion pancréatique de caséine, peptone de soya, extrait de levure, extrait de boeuf, acide ascorbique, P-disodium glycérophosphate (GP), sulfate de magnésium (MgSC⁺) et eau. C'est le pouvoir tampon du GP (ce qui le distingue du milieu M16) qui permet globalement une meilleure croissance et qui réduit les dommages et la mort des cellules qui sont causés par le faible pH obtenu (dû à l'acide lactique produit) avec d'autres milieux de culture. Habituellement, une exposition prolongée à un milieu acide altère l'intégrité de la paroi cellulaire et peut tuer la cellule. De plus, cela peut encourager la perte de plasmides possédant des gènes codant pour une activité importante. L'incorporation de GP dans un milieu de culture minimise la perte de ces activités et la mort cellulaire (Terzaghi et Sandine, 1975).

Les autres ingrédients de ce milieu de culture ont également des rôles importants. Les peptones et les dérivés de viande servent de sources de carbone, d'azote, de vitamines et de minéraux. L'extrait de levure ainsi que l'acide ascorbique stimulent la croissance bactérienne. Finalement, le sulfate de magnésium fournit les ions essentiels à la croissance. Habituellement, du lactose est ajouté au milieu M17 afin de conserver l'habilité des lactocoques à l'utiliser. En effet, l'information génétique permettant l'utilisation de ce sucre est située dans un plasmide chez *L. lactis* (Thompson & Gentry-Weeks, 1994).

KCA et Turner (Turner, 1963 ; Waes, 1968) pour tester le pouvoir réducteurs des souches de *Lactococcus* Le milieu KCA s'est avéré être le plus sélectif vers lactocoques (Gemelas, *et al.*, 2013), FSDA (gélose différentielle Rapide Lent) ; PCA (Plate Count Agar) additionné de lait (1%) (Huggins et Sandine., 1984) ont pour but de séparer les souches protéolytiques des celles qu'elles ne le sont pas, Milieu Elliker modifié ; et milieu de Chalmers sont des milieux

sélectifs qui mettent en évidence les bactéries acidifiantes (Chamba, *et al.* 1981; Vanos et Cox, 1986).

Des composés sont parfois ajoutés aux milieux de culture comme l'ajout de l'azure sodique inhibiteur de bactéries gram négatif, l'indicateur l'acidité (pourpre de bromocrésol) est parfois ajoutés au PCA ou à la gélose M17 afin d'améliorer leur efficacité dans la détection de LAB et surtout lactocoques (Desmasuret et Gueguen, 1997).

Différents milieux culture ont été testés (Gemilas *et al.*, 2013) sur 8 souches afin de mettre en évidence leur capacité dans l'évaluation de la population de *Lactococcus* dans le lait cru.

Le milieu M17 (Terzaghi et Sandine., 1975), M17 Nal (Gemilas *et al.*, 2013), Elliker (Elliker *et al.* 1956), Elliker modifié (Chamba., 1981), PCA + lait (Desmasuret et Gueguen., 1997), KCA modifié (Waes., 1968), Chalmers modifié (Vanos et Cox., 1986), Turner (Turner., 1963), FSDA (Huggins et Sandine., 1984). Les résultats ont montré que le **Milieu KCA et Turner** se sont avérés les milieux les plus sélectifs pour les espèces du genre *Lactococcus* comme le montre dans le Tableau 06 :

Tableau 13: Milieux de culture pour la croissance de micro-organismes importants en laiterie (Hardy, 1987).

Micro-organisme	Température	Aw	Milieu
<i>Lactococcus lactis</i>	30	0.96	Elliker
<i>Streptococcus thermophilus</i>	37	0.98	Elliker
<i>Lactobacillus heveticus</i>	37	0.96	MRS
<i>Propionibacterium shermanii</i>	30	0.95	Lait peptoné
<i>Micrococcus lactis</i>	30	0.94 à 0.97	Surface fromage
<i>Oospora lactis</i>	30	0.94 à 0.97	Surface fromage
<i>Penicillium camemberti</i>	24	0.86	Lactosérum gélosé
<i>Mucor</i> sp	24	0.92	Lactosérum gélosé

Tableau 14: Résultats de la croissance des 18 souches (GEMELAS et al., 2013) sur huit milieux de culture (FSDA, Elliker modifié, M17 NaCl, PCA + lait, Elliker, Chalmers modifié, KCA modifié, Turner et sur le milieu du M17 modifié).

	<i>L. niche</i>	<i>L. esgaray</i>	<i>L. ferrius</i>	<i>L. phaneron</i>	<i>L. germaine</i>	<i>L. chabotivae</i>	<i>L. saucisolei</i>	<i>L. albanostariae</i>	<i>L. rumanov</i>	<i>L. fassatis</i>	<i>L. fassatis</i>	<i>L. albanostariae</i>	<i>L. phaneron</i>	<i>L. germaine</i>	<i>L. chabotivae</i>	<i>L. saucisolei</i>	<i>L. rumanov</i>	<i>L. fassatis</i>	<i>L. fassatis</i>
FSDA	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ													
Modified elliker				Δ										Δ	Δ	Δ	Δ		
M17																			
M17 NaCl																	Δ		Δ
PCA - milk																			
Elliker																			
Modified chalmers									Δ				Δ	Δ			Δ		
Modified KCA							Δ	Δ	Δ			Δ	Δ	Δ	Δ				
Turner							Δ	Δ	Δ			Δ	Δ	Δ	Δ				Δ

Chapitre I: MATERIEL ET METHODES

L'objectif recherché à travers cette étude consiste à isoler à partir du lait cru de chèvre des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactococcus* tout en procédant à leur purification et leur identification, suivie l'étude de leur aptitudes technologiques.

I-1. MATERIEL:

I-1.1. Provenance et prélèvement des échantillons:

Les prélèvements de lait proviennent de troupeaux de chèvres localisés à Sidi Belabbes dans la région tenira la race arabia. Le second prélèvement à été effectué à partir des chèvres d'un troupeau appartenant à la même race, localisée à Mostaganem dans la région de Masra. Un nettoyage correct de la mamelle est effectué avant la traite. Il est indispensable pour éviter les contaminations de lait. Le lait est recueilli dans des flacons stériles de 250 ml, conservé et transportés, dans une glacière au laboratoire.



Figure 12 : échantillons de lait de chèvre prélevés dans la région:

A) Tenira (Sidi Belabbes) B) Masra (Mostaganem)

I-1.2. Milieux de cultures:**I-1.2.1- Milieux d'isolement et de purification:**

Milieu Elliker (Elliker et Anderson, 1956) lactosé, gélosé ou liquide est utilisé pour le repiquage et le maintien des souches de bactéries lactiques.

La composition de ce milieu de culture est indiquée en annexe N°1.

I.1.3. Produits chimiques et réactifs:

- *Les colorants :*

Violet de Gentiane, fuschine, Cristal violet, bleu de méthylène,

- *Les acides et les bases :* HCl, NAOH de 1 N

Les réactifs: réactifs de Vogues Proskauer (VPI et VPII),

- *Alcool et autres:* Ethanol, lugol, eau oxygénée, citrate ferrique, ferricyanure de potassium, sucres (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, raffinose, lactose, sorbitol, mannose, l'amidon, esculine, rhamnose, maltose.)

I-1.4 Matériel utilisé pour les analyses**A) -verrerie usuelle :**

- Erlenmeyers 250g, éprouvettes, béchers, fioles, pipettes graduées, tube à essais, entonnoirs, béchers, spatule, burette, fiole jaugée
- pipettes pasteur, tube à essai, boite pétri en plastique stérile, lame, lamelle.

I-1.5. Appareillage:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| -Bec Bunsen ; | -Réfrigérateur ; |
| -Anse de platine; | -Balance analytique ; |
| -Vortex électrique; | -pH mètre ; |
| -Autoclave; | -Four Pasteur ; |
| -Centrifugeuse; | -Bain Marie ; |
| -Microscope optique ; | -Micropipettes ; |
| -Agitateur électrique ; | -Balance de paillasse ; |
| -Etuves ; | |

I-2. Méthodes d'analyse:**I- 2.1. Techniques d'isolement et de purification:****I-2.1.1/ Techniques d'isolement:**

L'isolement a été effectué à partir des échantillons considérés comme sains (non contaminés) le jour même de leur réception.

A- *Préparation des dilutions :*

Une série de dilutions décimales est réalisée à partir de l'échantillon que l'on aura homogénéisé au moins 10 secondes d'agitation. 1 ml d'échantillon à analyser (lait cru de chèvre) est ajoutés dans 9 ml d'eau physiologique stérile. On Obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales Jusqu'à 10^{-6} ., les dilutions ont été Choies de manière à obtenir un certain nombre de colonies convenables des bactéries lactiques. 1 ml des dilutions 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} , prélevé estensemencé en profondeur. Puis On coule le Milieu ELLIKER, Les boites sont ainsi incubées Dans les mêmes conditions à 30°C pendant 48 heures. Cette méthode est utilisée pour que les colonies s'éclatent librement et qu'elles soient facilement aperçues.

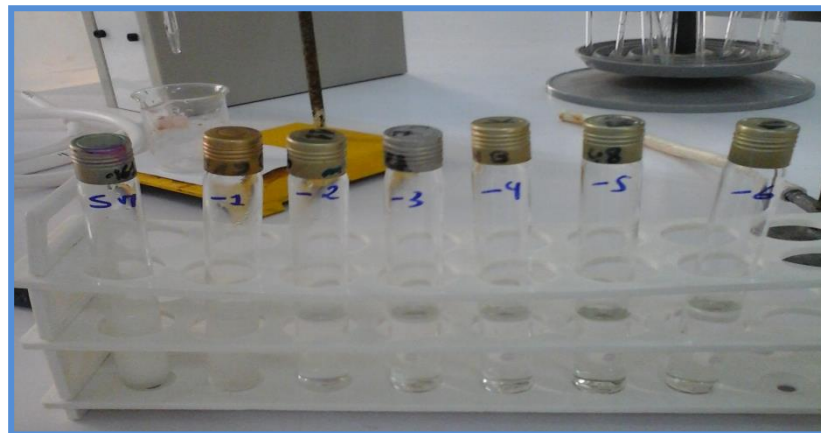


Figure 13 : préparation des délutions à partir du lait de chèvre.

I-2.1.2/ Techniques de purification:

Les colonies ont été prélevées au hasard, 60 isolats présentant l'aspect macroscopique des bactéries lactiques (forme taille aspect et couleur sont repiquées dans milieu ELLIKER liquide, puis incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation l'apparition d'un trouble indique la croissance des bactéries, 0.1 ml de chaque tubes positif est ainsiensemencé par stries sur Elliker solide suivie d'une incubation à 30°C pendant 48h. Les colonies ainsi obtenues sont

repiquées sur milieu Elliker solide afin de les purifier. L'identification des colonies obtenues sur les milieux a été établie par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

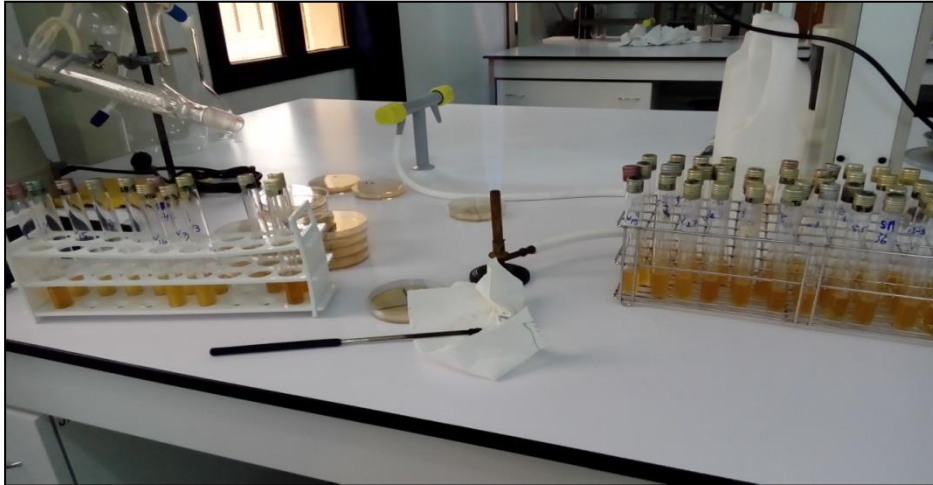


Figure 14: L'étape de purification sur le milieu ELLIKER lactosé.

I-2.1.3/ Conservation des souches:

Les souches sont ensemencées sur gélose Elliker inclinée en tube. Ces cultures sont gardées à 4°C. les repiquages se font toutes les deux semaines. Pour conservation de longue durée une culture de 18h est centrifugée (4000 tr /min pendant 10 min). Puis le culot est lavé. Le milieu de conservation est présenté par du lait écrémé auquel est additionnée du glycérol à 30% et 1% d'extrait de levure. La culture est conservée à -20°C .

I-2.2. Techniques d'identification des souches isolées:

L'identification des souches purifiées est réalisée selon une procédure à plusieurs étapes successives comme le montre la **figure 14**.

I-2.2.1/ Etude des caractères culturaux:

La culture des souches purifiées sur gélose ELLIKER permet d'obtenir des colonies séparées nous permettrons de décrire la taille, la couleur, l'aspect (brillant, mat, muqueux), la consistance, le contour et la forme. Cet examen peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire.

I-1.2.2/ Etude des caractères morphologique des cellules:

La coloration de Gram est effectuée sur frottis. Les bactéries à Gram positif sont de coloration Violette , celles à Gram négatif sont de coloration rose.

L'observation microscopique des cultures permet de mettre en évidence la morphologie, la taille et l'arrangement des cellules.

Des caractères structuraux peuvent éventuellement être mis en évidence par le biais de la coloration de Gram qui permet une distinction des bactéries en deux grands groupes, en fonction des colorations finales des cellules. Les différences de coloration proviennent de différences structurales de la paroi bactérienne.

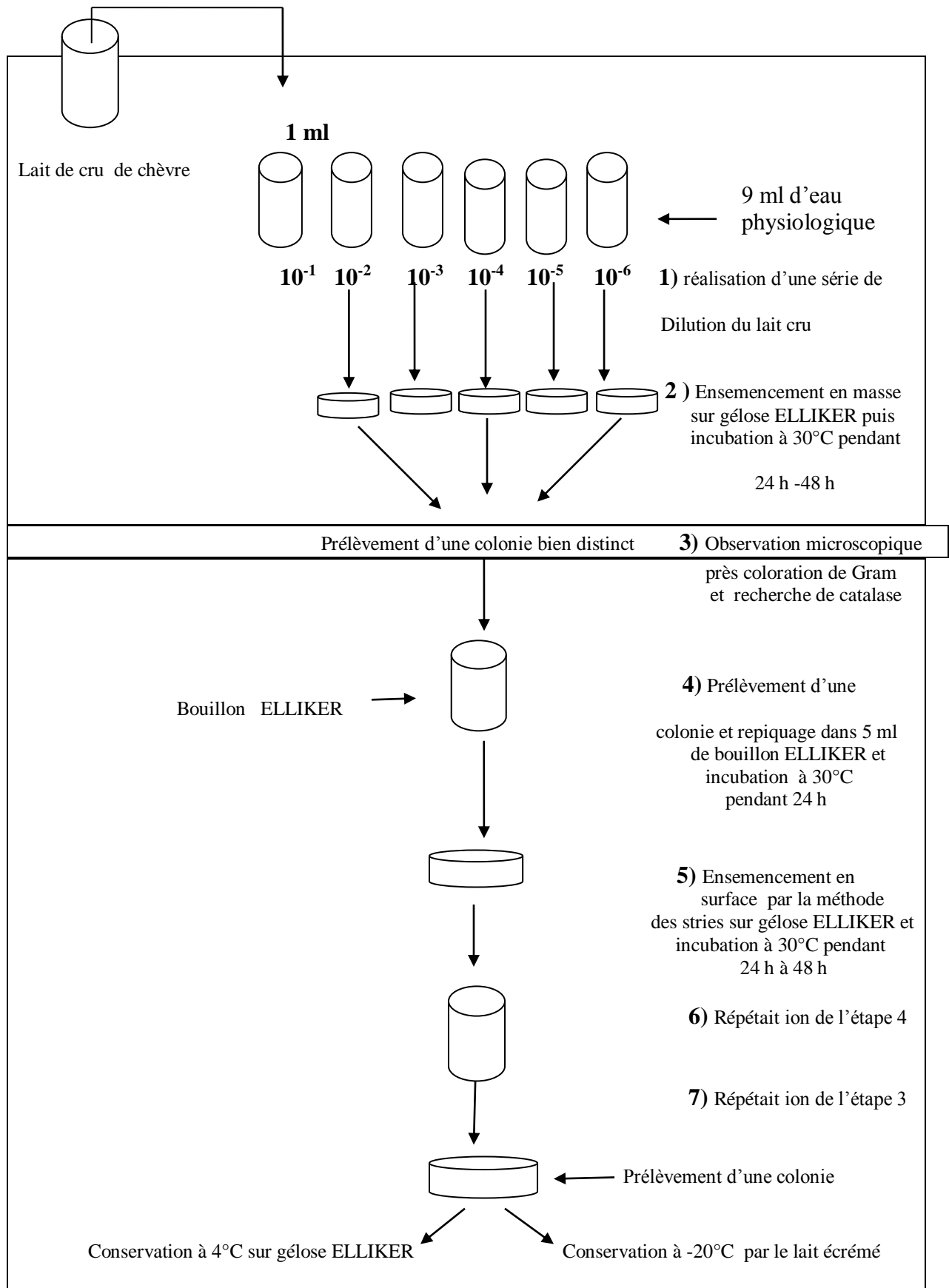


Figure 15: Diagramme d'isolement et de purification des lactocoques

I.3. Tests physiologiques et biochimiques:***I. 3.1-Recherche de la catalase:***

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Ahmed et Irene, 2007).

I.3.2 -Type fermentaire:

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par le lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence la fermentation de gaz (CO₂). C'est ainsi qu'on peut classer les bactéries lactiques en homo ou hétéro-fermentaires. Les souches sont cultivées dans des tubes contenant Elliker liquide avec une cloche de Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Kihal, 1996 ; Hariri *et al.*, 2009). Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 1% de CO₂. Les souches hétérofermentaires quant à elles, vont produire de l'acide lactique et du CO₂ à proportion égales, ce qui va être mis en évidence par la cloche de Durham qui se remplit de gaz (Carr *et al.*, 2002).

I.3.3-Culture sur lait de Sherman :

Les isolats purifiés sur Elliker liquide sont ensemencés dans deux séries de tubes contenant 9ml de lait écrémé stérilisé additionné de 1ml de bleu de méthylène à 1% pour la première série et à 1ml de bleu de méthylène à 3% pour la deuxième série, Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

Le bleu de méthylène est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit, ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ce sont des microaérophiles, ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) ne vira que légèrement vers le blanc et contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilisent tous l'oxygène de bleu de méthylène (Larpen *et al.*, 1990), la décomposition du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (Delarras, 2007). Ce dernier test permet aussi de différencier entre les espèces de

lactocoques ainsi *lc. lactis* est capable de pousser en présence de 0,3% de bleu de méthylène (Badis *et al.*, 2004). Et pour distinguer les streptocoques qui ne réduisent pas le bleu de méthylène des autres coques lactiques (Guiraud, 2003).

1.3.4- La thermorésistance :

Ce test destiné aux coques, il permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester sont préalablement réparties dans des tubes de milieu Elliker. Ces tubes sont par la suite exposés à un chauffage du bouillonensemencé par une culture jeune à une température 60°C pendant 30min.

A partir de chaque tube traité on aensemencé un nouveau tube de milieu Elliker et porté à incubation à 28C° pendant 48H. Les isolats qui ont poussé après ce traitement sont considéré comme thermorésistants (Stiles et Holzapfel, 1997).

1.3.5 -Tolérance au pH alcalin :

La croissance en milieu alcalin permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* (Devriese *et al* 1993). Le milieu utilisé est le bouillon Elliker ajusté à pH 9,6.

1.3.6-Culture sur milieu hypersalé :

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl.

Après une incubation à 37°C pendant 48h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (Guiraud, 1998). Ce test permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (Stiles et HolzapfeL, 1997).

Un témoin est représenté par un tube contenant le milieu hyper salé nonensemencé est incubé dans les mêmes conditions.

1.3.7 -Croissance à différentes températures:

Ce test est important car il permet de distinguer Les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du Bouillon Elliker par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux Températures 10°C, 40°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (Idoui *et al.*, 2009).

1.3.8 -Recherche de l'arginine Di-hydrolase (ADH) :

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, une gélose rapportée par Thomas (1973). Ce milieu contient du lactose (pas plus de 2mg/ml), de l'arginine (4mg /ml) et du pourpre de bromocrésol (0,05mg/ml) (voir annexes).

Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du lactose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

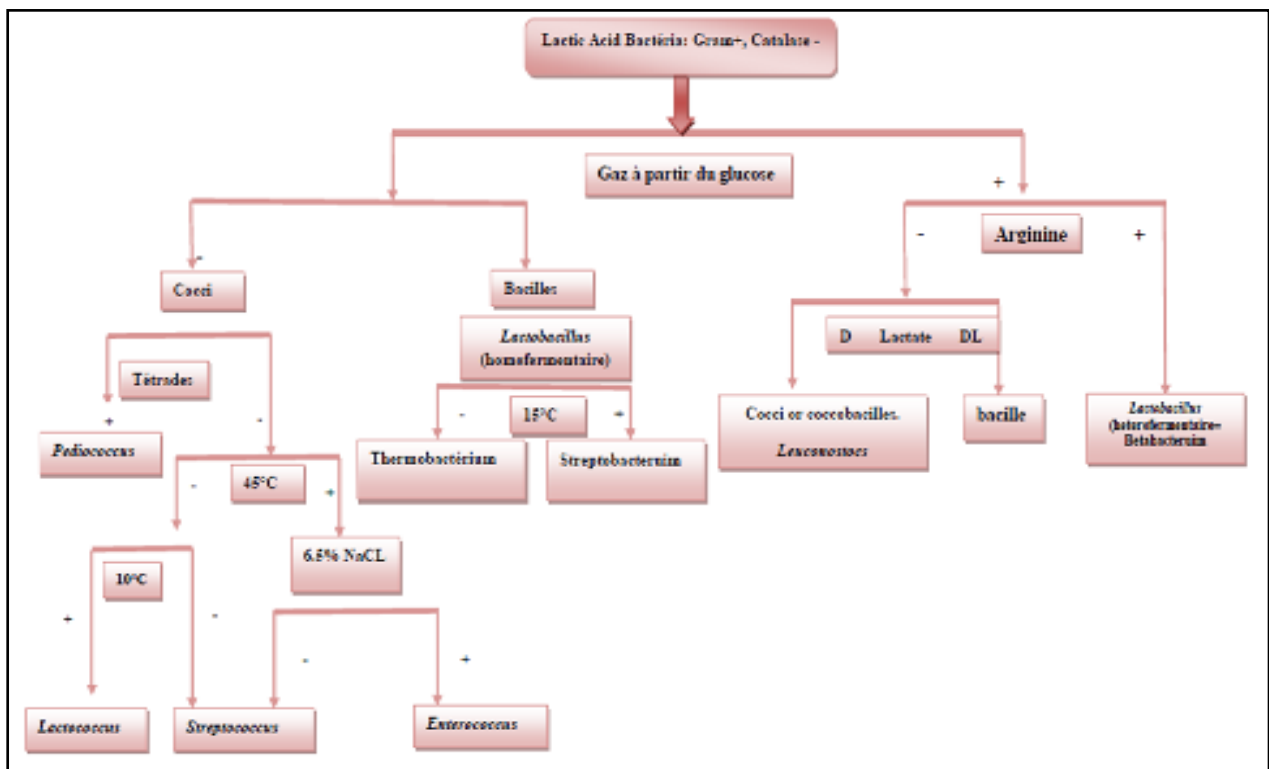


Figure 16 : Clé d'identification des bactéries à Gram positif (Carr *et al.*, 2002).

1.3.9-La production d'acétoïne:

La production d'acétoïne est testé sur milieu Clark et lubs (Samelis *et al.*,1994 ;Guiraud 1998) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30°C. Après une incubation de 24h on ajoute deux réactif VPI (0,5 ml d'une solution alcoolique d'alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 90°) et VPII (0,5 ml d'une solution de soude à 16% dans l'eau distillée). Les tubes sont soigneusement agités et chauffés avec précaution sur flamme d'un bec Bunsen

jusqu'à commencement de l'ébullition après agitation pendant 30 seconde sur un agitateur vibreur de type de vortex, une coloration rouge cerise franche indique une réaction de VP positif (King,1948).

I.3.10-Recherche de la citratase :

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kemppler et Mc Kay (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide. Les colonies qui fermentent le citrate déclenchent la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 18h-24h) d'incubation à Température 28°C. Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanchâtre.

I.4. L'utilisation des carbohydrates :

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande, sans sucre et additionné au pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur de pH (Badis et al, 2005). La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : arabinose, glucose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannitol, esculine, sorbitol, rhamnose, saccharose, raffinose, ribose, amidon, melibiose et xylose. Les solutions sucres sont préparées à 3% et stérilisées par tyndalisation.

Vu le nombre important de souches étudiées, des plaques d'Elisa ont été utilisées. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera testé pour différentes souches .

Une solution bactérienne servant à ensemercer les puits contenant les différentes sources de carbone a été préparée. Une culture de 18 heures de la souche appropriée est centrifugée à 6000 tour /minute pendant 15min. le culot est récupéré et additionné à 1,5 ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur, cette action est répété deux fois (2 lavages). 1,5 ml du milieu MRSBCP-EV est additionnée a ce culot, pour fournir la solution cellulaire servant à ensemercer les puits de la plaque Elisa contenant différentes sources de carbone ; 50µl de cette solution bactérienne est déposée dans chaque puits avec 50µl de sucre, et 200µl du milieu MRSBCP-EV, le tout recouvert par une goutte d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose.

La lecture des résultats se fait après 24 et 48h d'incubation (Guessas, 2007).

I.5. Activité protéolytique:

L'évaluation qualitative de l'activité protéolytique (activité protéolytique) des souches testées a été réalisée sur milieu Milk Agar selon la méthode de Fransen *et al.*, (1997), les souches lactiques sont ensemencées par la méthode de spot et incubées à 28C° pendant 24h En aérobiose. Lorsque la caséine du milieu gélosé opaque est dégradée en fraction azotées solubles. les diamètres des zones translucide de protéolyse sont mesurés (Thapa *et al.*, 2006) . Le résultat est comparé à un témoin positif.

II.1. Isolement et purification des souches

II.1.1. Aspect macroscopique:

L'observation macroscopique des cultures sur les géloses, révèle la présence des colonies de petite taille, blanches, ou crémeuses, lenticulaires ou circulaires, brillantes, ne présentant pas un aspect filamenteux, parfois, les bords de certaines colonies sont plus claires et éblouissantes (**Figure 17**).

Seules les bactéries Gram positive et catalase négatif qui se présentent sous forme en coques isolées, en paires ou en chainettes sont retenues.

Les colonies ne présentaient pas une grande hétérogénéité morphologique, sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

L'aspect des colonies visqueuses Signe à la production du dextrane sur Elliker lactosé utilisé pour la purification des bactéries lactiques.

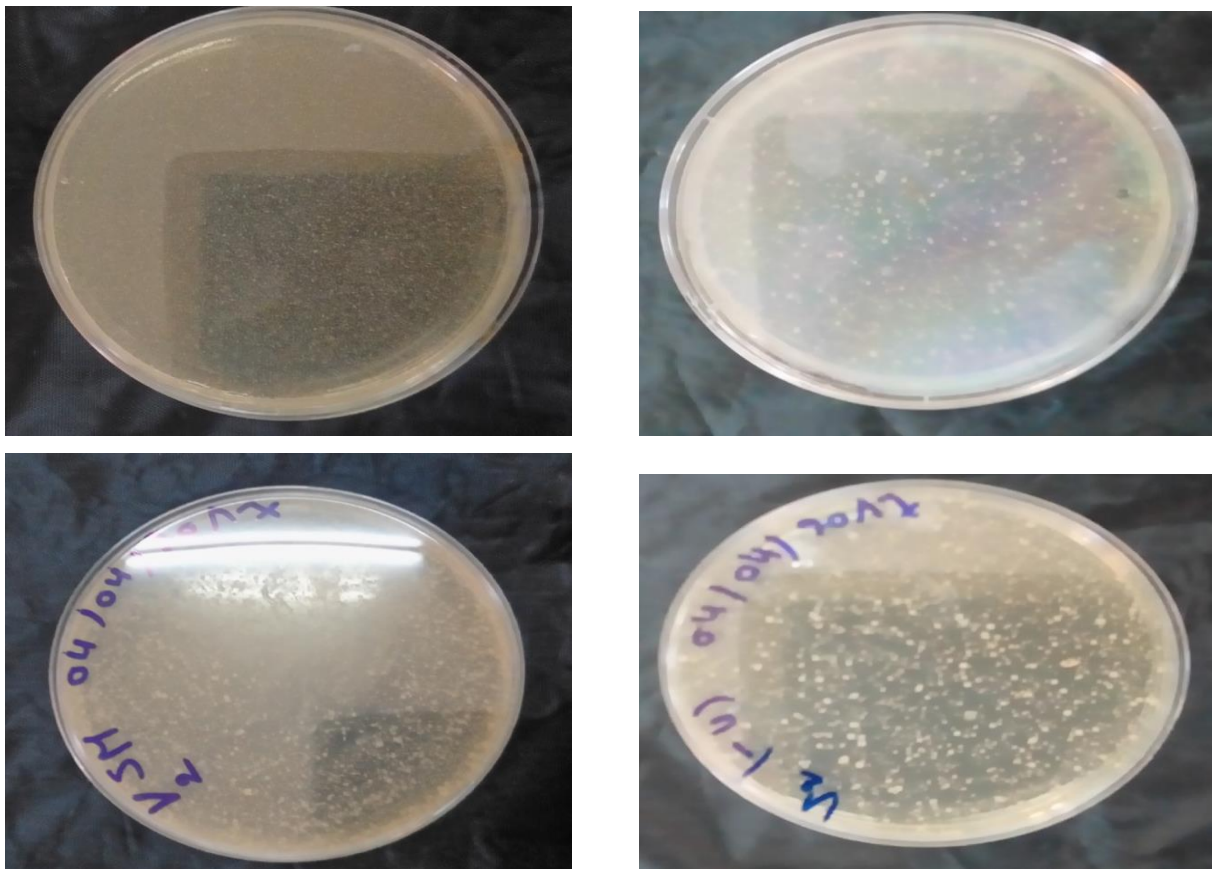


Figure17: Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactique sur milieu gélosé Elliker lactose.

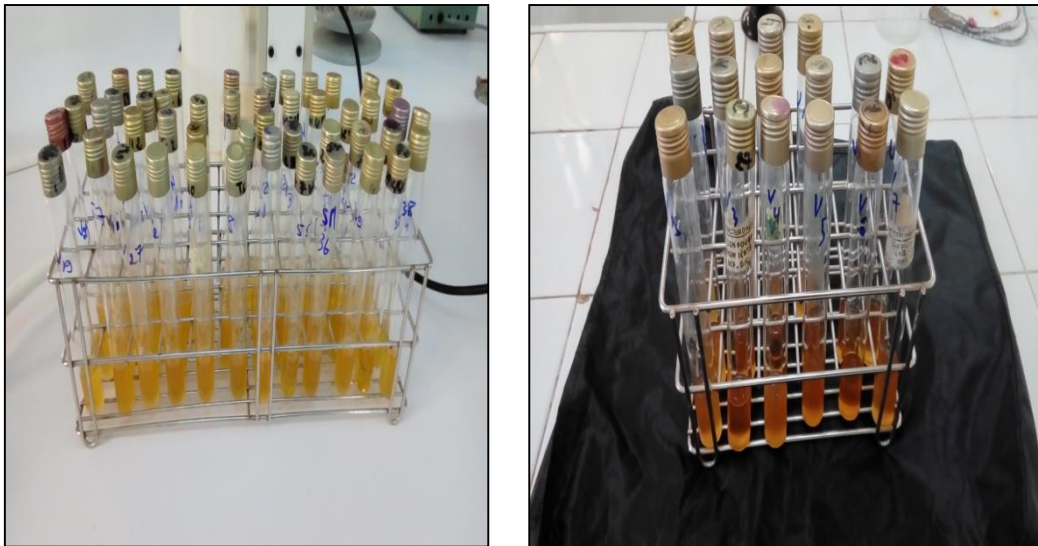


Figure 18: Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide ELLIKER lactose.

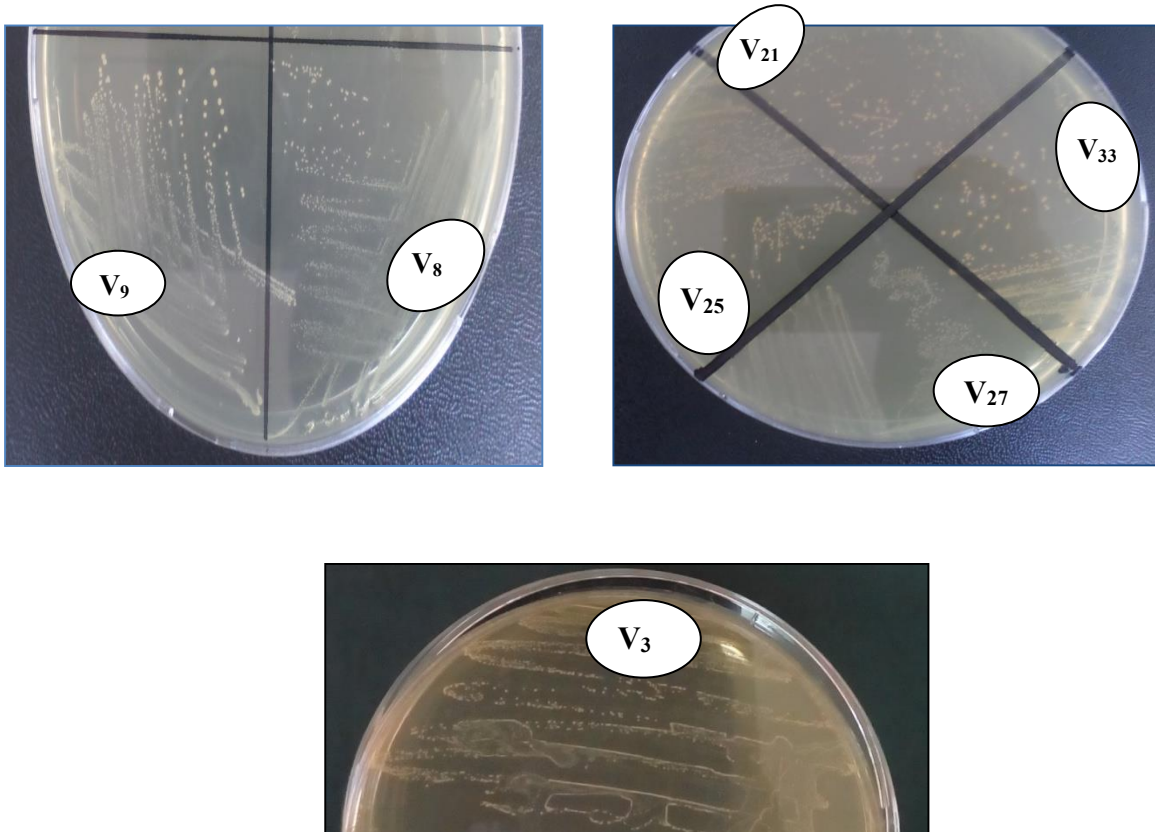


Figure 19: Aspect macroscopique des colonies de Lactococcus sp. sur milieu solide Elliker lactose.

II.1.2. Test de la catalase :

Ce Test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par **Prescott *et al.*, 2003**. Ce test consiste à mettre une colonie prélevée de l'eau oxygénée, le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase qui signifie que le test est positif.

D'après ce test, les souches purifiées présentent une catalase négative. Ce caractère indique l'appartenance des bactéries lactiques au genre *Lactococcus* (bactéries à Gram+ aérotolérantes à ne pas posséder de système respiratoire ni cytochrome, ni catalase) (**DESMAZEAUD et DE ROISSART, 1994**).

II.1.3. Aspect microscopique :

L'examen microscopique fournit des renseignements concernant la morphologie des bactéries (cocci, bacilles, spirales, à bord parallèles ou non à extrémités arrondies ou effilées...). ainsi que leur taille. La coloration de Gram de les classer en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, ainsi que d'observer des arrangements particuliers (diplocoques, palissades, chaînettes, tétrades...).

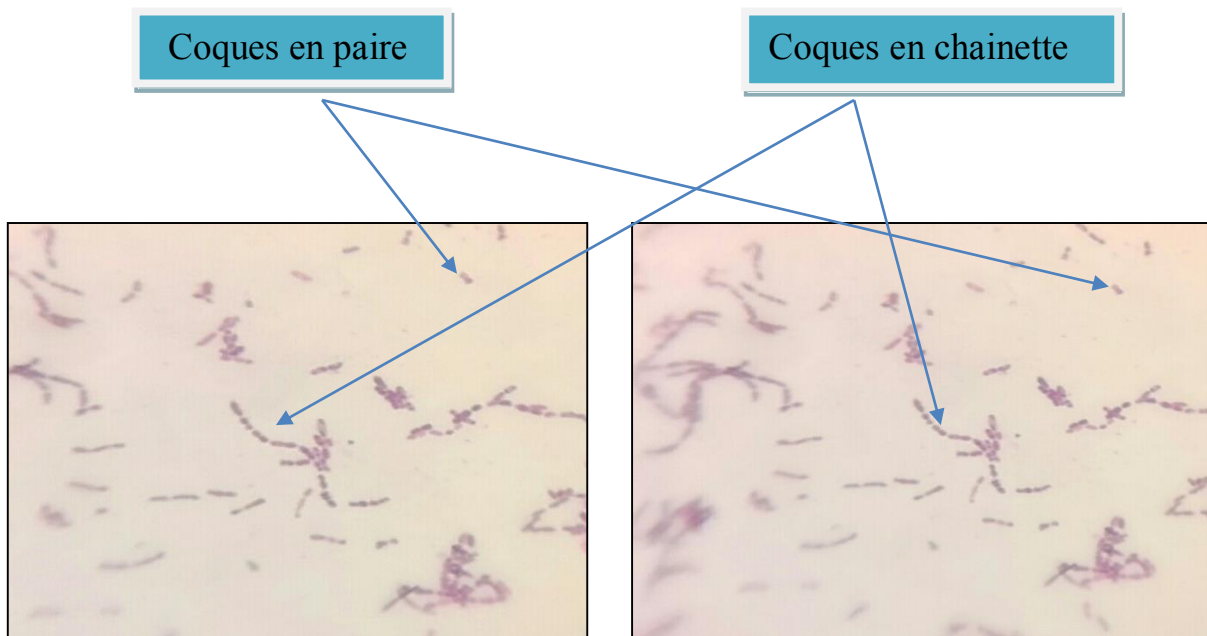


Figure20 : Aspect microscopique de *Lactococcus sp* après coloration de GRAM (Gr : X1000)

II.2. Identification des souches isolées :

II.2.1. hydrolyse de l'arginine :

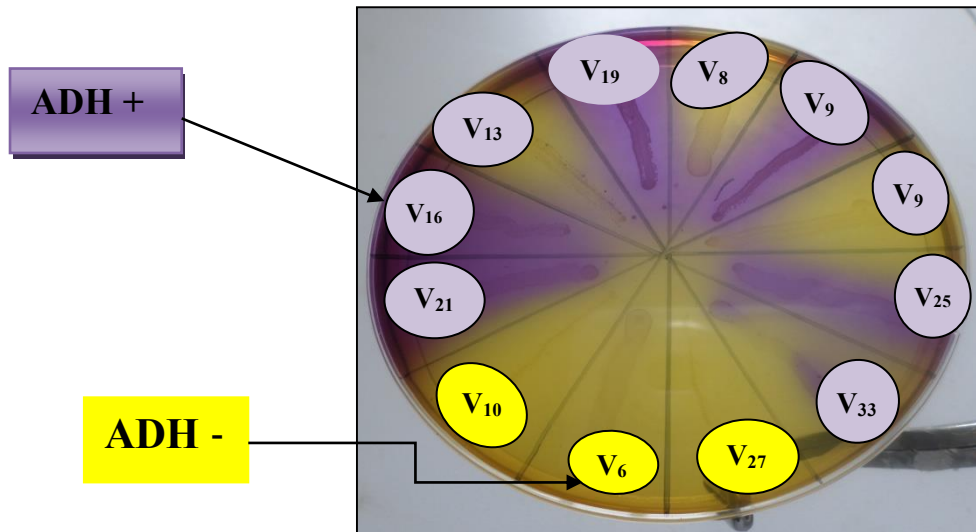


Figure 21 : La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH) après 48h.

II.2.2. Type fermentaire :

- L'Absence du gaz dans la cloche indique l'appartenance au type homofermentaire.

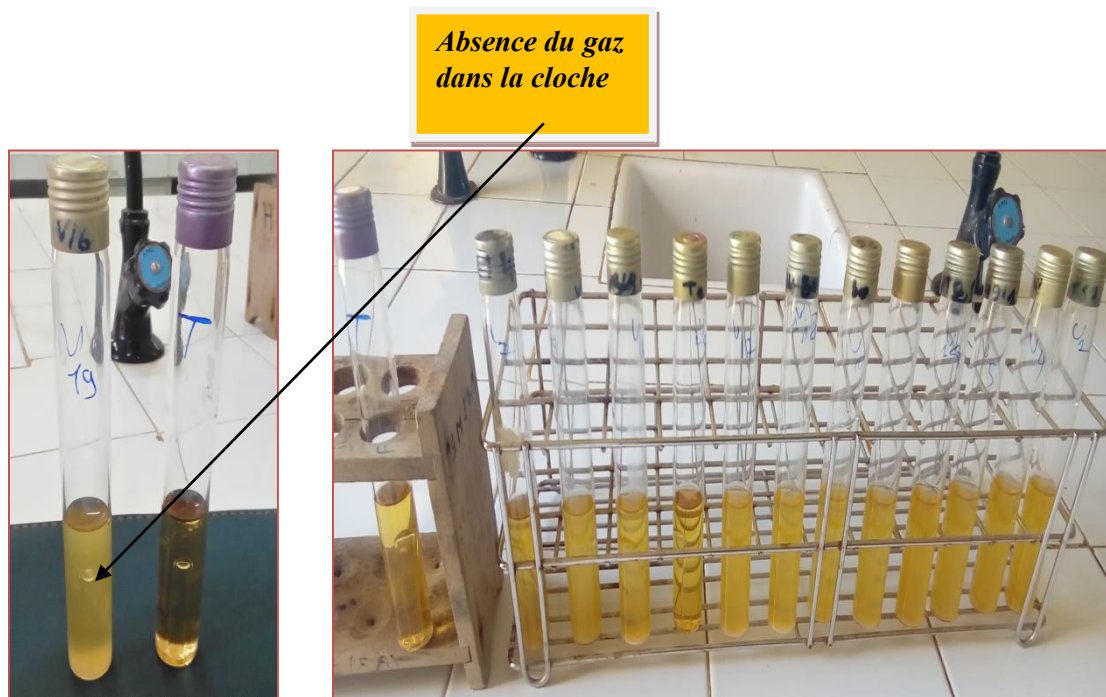


Figure 22 : Résultat de type fermentaire des isolats.

II.2.3.Lait de Sherman :

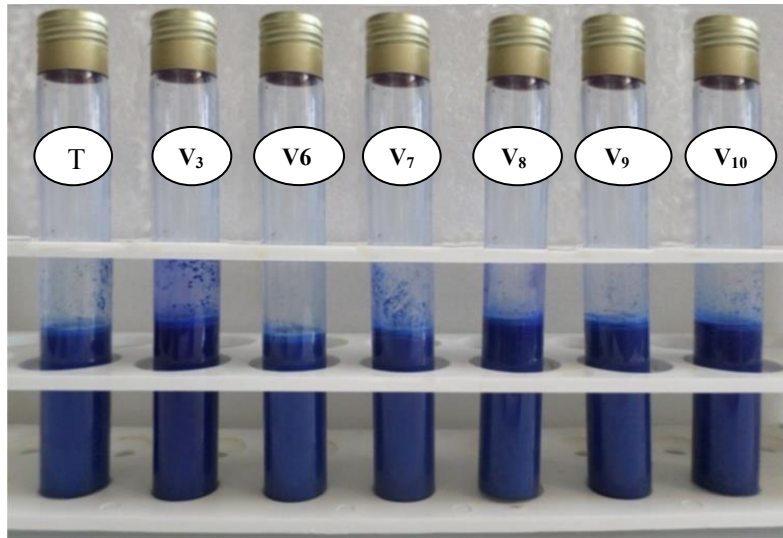


Figure23 : Résultat du test de lait de Sherman a 3% .

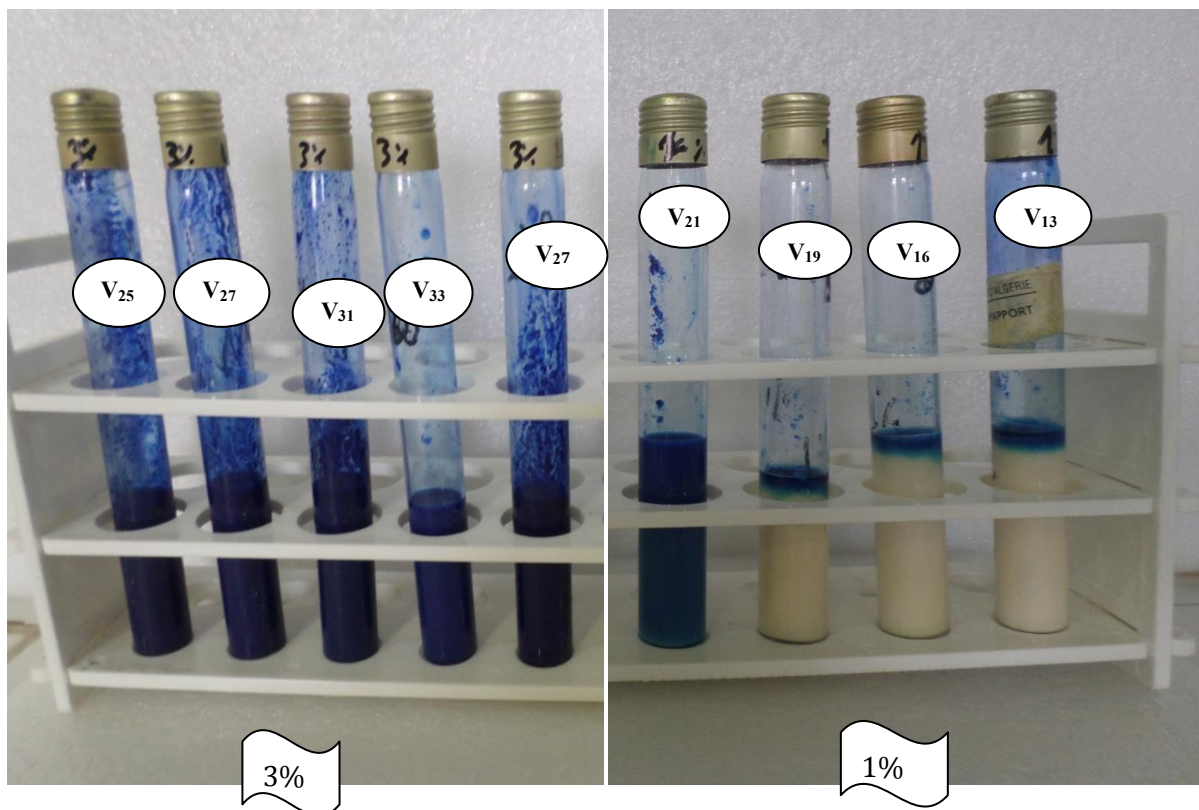


Figure 24 : Résultat du test de lait de Sherman
0,3 % de Bleu de méthylène ; 0.1 % de bleu de méthylène

II.2.4. L'utilisation de citrate :

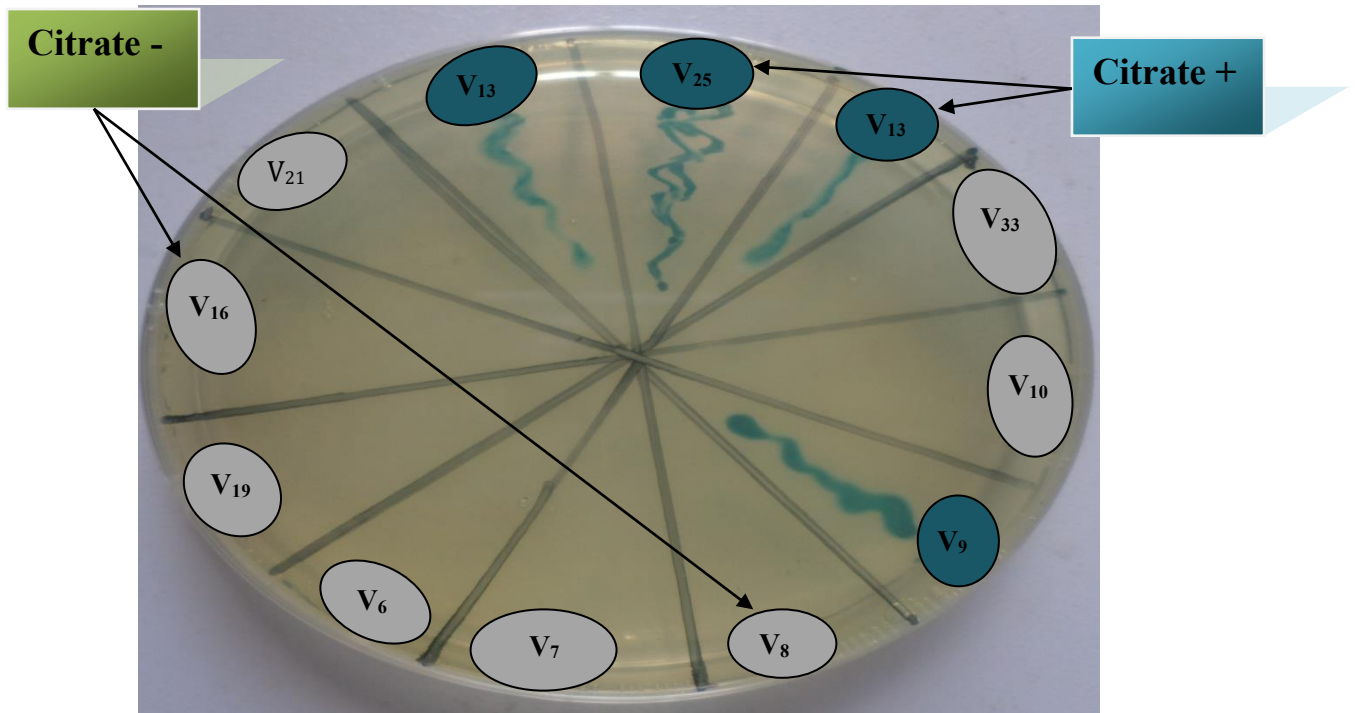


Figure 25 : Test de réduction de citrate sur milieu KMK.

II.2.5. La croissance en conditions hostiles :

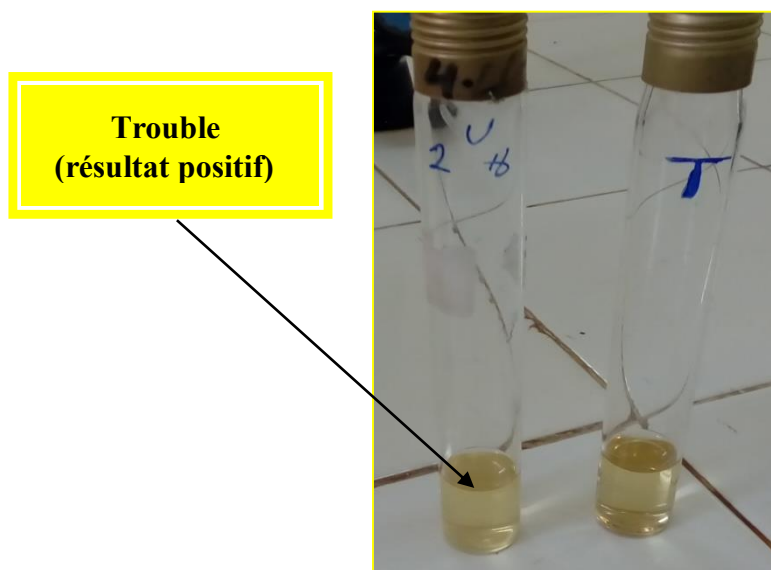


Figure 26 : Résultat du test de résistance sur milieu hyper salé (4% NaCl).

-Pour le test de résistance sur milieu hyper salé de 6.5% de NaCl, Aucune croissance des isolats purifiés n'a été constatée.

Témoin

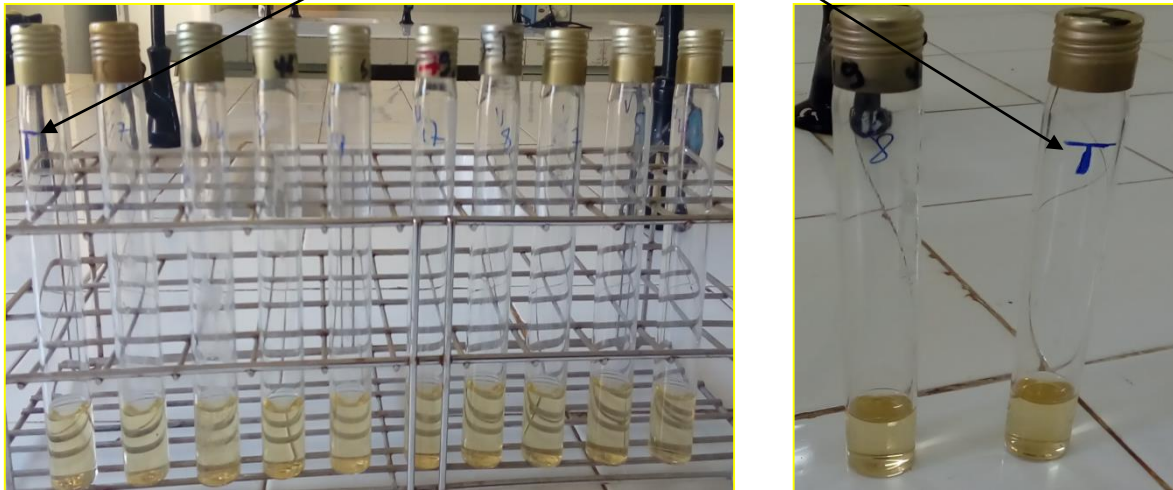


Figure 27: Résultat du test de résistance sur milieu hyper salé (6,5% NaCl).

- La croissance est mise en évidence par l'apparition d'un trouble sur milieu d'un PH=4.

**Trouble microbien (résultat positive)
PH= 4**

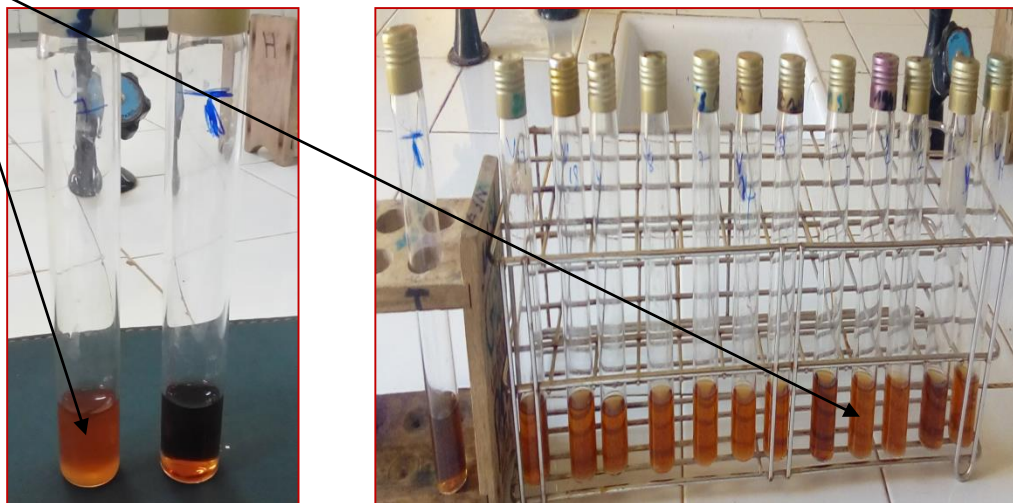


Figure 28: Résultat de la croissance des isolats à pH 4, (souche V₂₇).

- Nous avons remarqué que la majorité des souches testées incapable de croître sur PH 9,6.

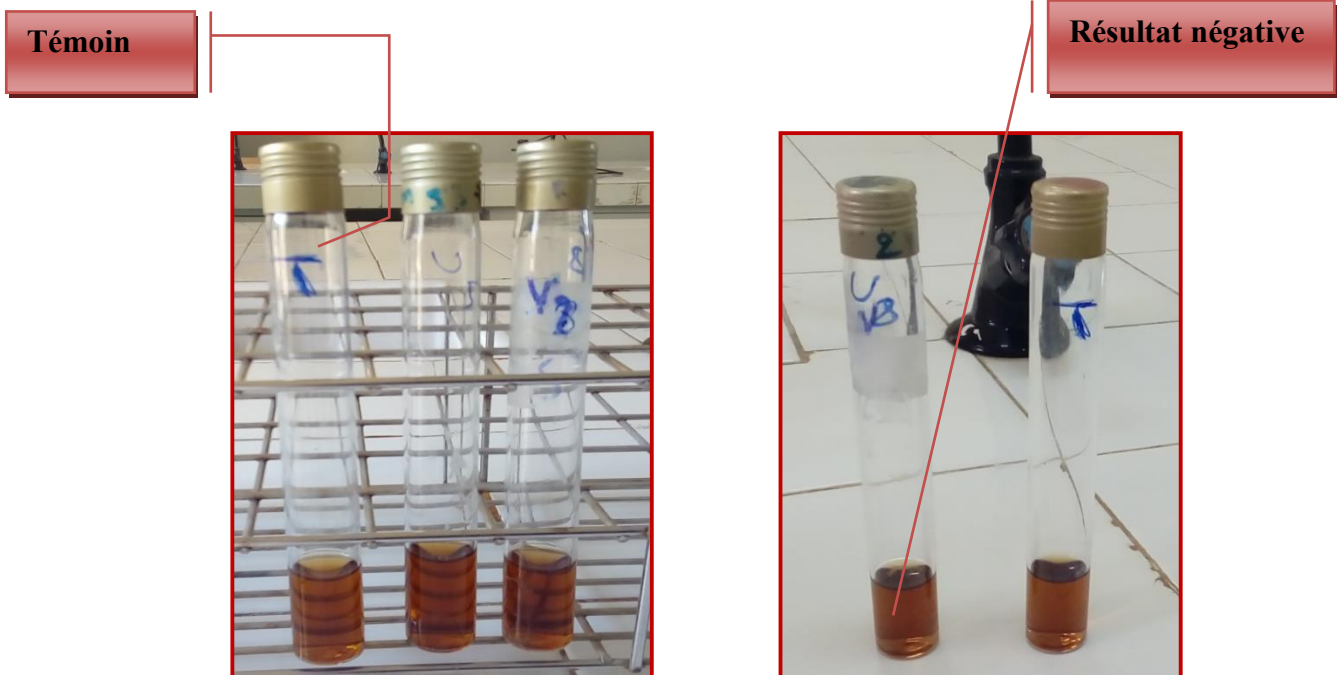


Figure 29: Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.

II.2.6. Test de la thermorésistance :

Absence de trouble pour tous les isolats testés, tous les isolats n'ont pas réussi à survivre après ce traitement de thermorésistance ce teste on a permet de sélectionner les lactocoques en éliminant les streptocoques et les entérocoques.



Figure 30 : Résultat de test de la thermorésistance.

II.2.7. La Température :

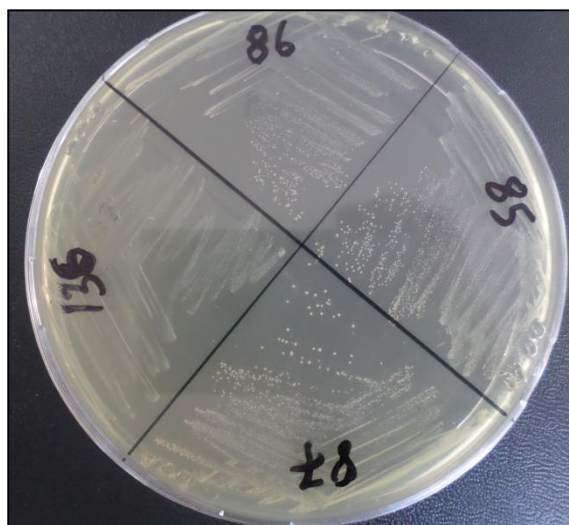


Figure 31 : Résultat du test de croissance à 10°C.

II.2.8. Production de l'acétoïne:

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, les espèces de *Lc.lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser le diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α -acétolactate (Raynaud *et al.*, 2003 ; Leroy et Devuyst, 2004).

- Anneau rouge (VP+)
- Pas d'anneau (VP-)

De nombreux auteurs ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyl et/ou en acétoïne (Monnet *et al.*, 2008). D'après Phalip *et al.* (1994), l'acétoïne est l'une 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.

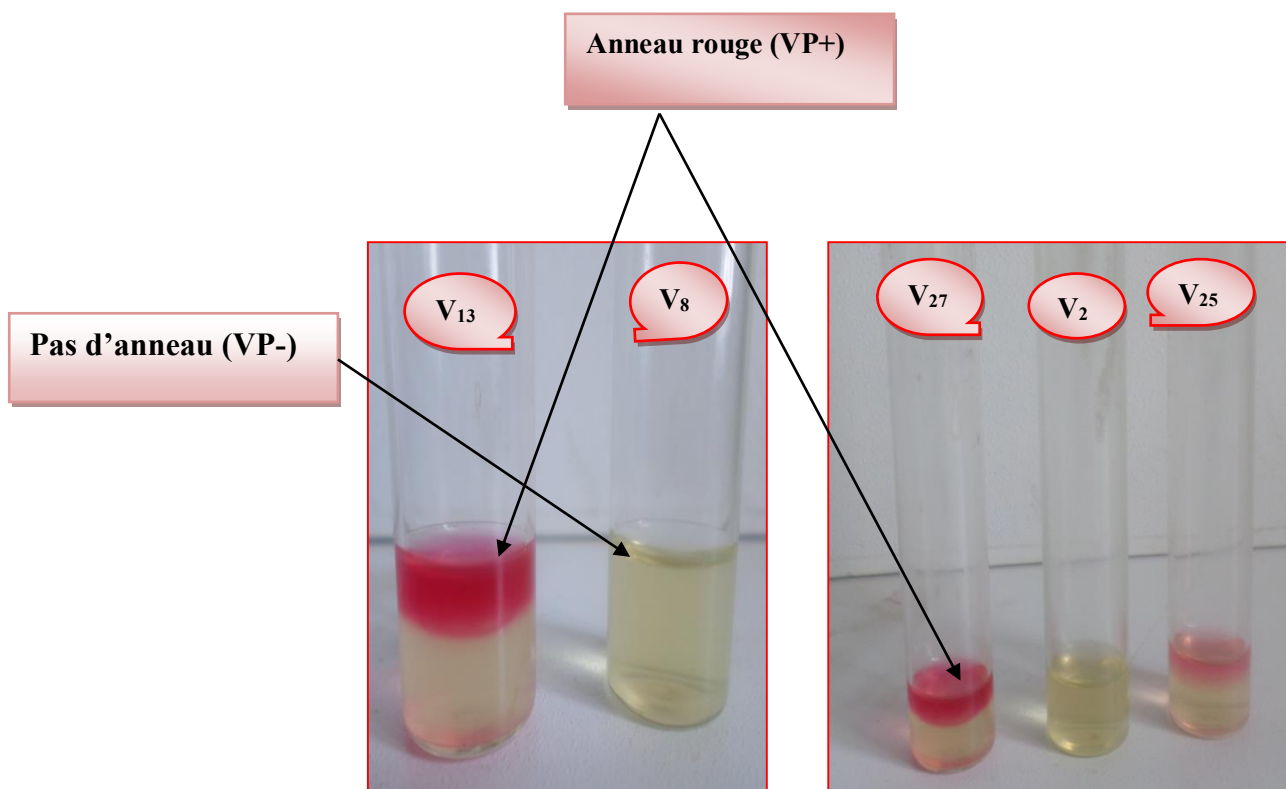


Figure 32: Test de la production d'acétoïne.

Tableau 15 : Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre *Lactococcus* isolées du lait cru de caprin.

Tests isolats	Gram	forme	Type fermentaire	B.M		ADH	ACT	CTR	NaCl		T°				pH	
				1%	3%				4%	6.5%	10°C	40°C	45°C	RES	pH4	pH9.6
V10	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
V19	+	Coqu	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
V31	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
V27	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
V9	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
V13	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+-	-	-	+	-	-	-	-	-
V21	+	Coqu	H.F	V	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
V7	+	Coqu	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
V16	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
V25	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
V3	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V33	+	Coqu	H.F	+-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
V27	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	V	-	-	+	-
V6	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	+-	-	-	+	-
V8	+	Coqu	H.F	V	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

-H.F : homofermentaire -ACT : production de l'acétoïne -B.M : bleu de méthylène -CTR : fermentation du citrate

-ADH: hydrolyse de l'arginine -RES: thermorésistance. -V: variable

- V27 , V6, V10, *Lactococcus plantarum*
- V13, v16, *Lactococcus raffinolactis*
- V21, v7, v33, v19, v8, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*
- V31, v9, v25, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
- V27, v3, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*

II.3. Profil fermentaire des sucres :

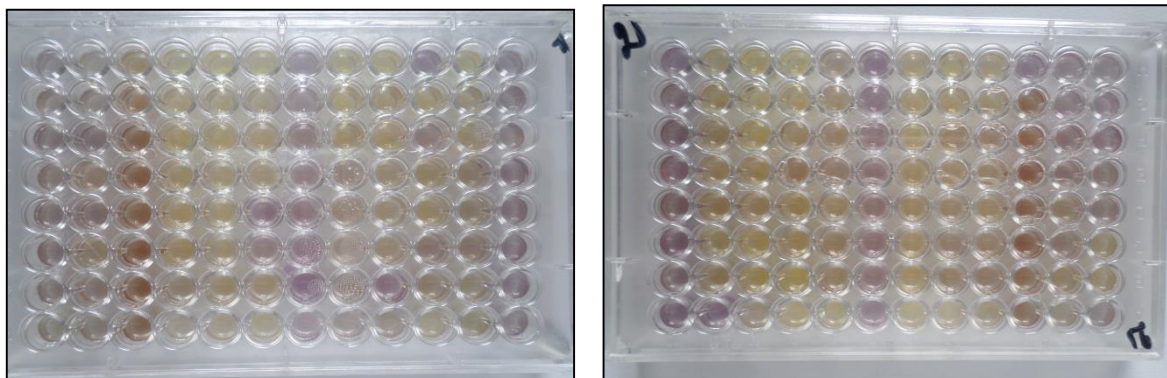


Figure 33 : *Résultats du test de sucre des isolats.*

Tableau 16 : Profile fermentaires des isolats du genre présumé *Lactococcus* sp.

Sucres souches	Manitol	raffinose	Amidon	Lactose	D-xylose	Sorbitol	Arabinose	Maltose	fructose	Rhamnose	Saccharose	esculine	Souches identifié
V10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>plantarum</i>
V19	-	+	-	-	+	+	+	-+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
V31	+	-	-	+	+	+-	+	+	+-	+-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
V27	-	++	-	-	+	-	+	+	+	-	+	V	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Plantarum</i>
V9	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
V13	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-+	+	+	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
V21	-	++	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
V7	-	+	V	-	+	+	+	+	v	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
V16	+	+	-	+	+	+	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
V25	+	-	-	+	-	-	+	+	v	v	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
V3	-	++	-	-	+	+-	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
V33	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
V27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>platarum</i>
V6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>plantarum</i>
V8	-	+	-	+	+-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> .

II.4. Caractérisation de l'activité protéolytique :

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait (El-Ghaishet *al.*, 2011).



Figure 34 : Activité protéolytique sur milieu Agar au lait.

Tableau17 : Activité protéolytique chez les lactocoques

ISOLAT	DIAMETRE/2
V ₁₀	2mm
V ₁₉	4mm
V ₁₃	7mm
V ₂₇	1mm
V ₉	7mm
V ₁₃	1,5mm
V ₂₁	4mm
V ₇	Pas d'activité
V ₁₆	7mm
V ₂₅	7mm
V ₃	8mm
V ₃₃	4mm
V ₂₇	Pas d'activité
V ₆	3mm
V ₈	6mm

Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le **tableau 17**. Il en ressort du tableau que toutes les souches étudiées présentent majoritairement une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques. Selon Vuilleumard ,1986 la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre **5** et **15** mm. Par comparaison à cette donnée, certaines souches sont révélées protéolytiques d'autres aucune activité n'a été signalé. Il apparaît clairement que l'espèce *Lc lactis* subsp. *Cremoris* (V₃) avec un diamètre de 8mm est fortement protéolytique comparativement aux autres espèces avec une moyenne de 8mm de diamètre, suivi de *Lc.lactis* subsp. *diacetylactis* (V₉ et V₂₅, V₁₃) avec un diamètre 7mm, d'autres espèces sont jugées moins protéolytiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Guessaset *al.*, 2012 Une légère activité protéolytique a été observée chez les souches *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (V₂₁ et V₃₃, V₁₉) avec un diamètre 4mm.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaine *et al.*, 2007).

Discussion :

A partir de deux échantillon du lait de chèvre, nous avons isolé 60 isolats ayant un profil homofermentaire à gram positif, à catalase négative à partir des quels 30 isolats cocci ont été retenus, parmi cette collection des coques on se basant sur les résultats du test de bleu de sherman, seulement 15 isolats représentatifs de la flore dominante ont été identifiés de manière complète par méthodes phénotypiques.

Au total, 15 isolats ont été identifié ont montré une capacité de croitre a 10°C et a 40°C mais pas à 45°C présentant une hémolyse□, quelques isolats se développent sur lait de Sherman 0.1% et non sur 0.3% et ainsi que dans un bouillon hypersalé à 4%. Ne se développent pas à pH 9,6 ne poussent pas à 6,5% NaCl et elles ne survivent pas après un traitement de thermorésistance, on les a attachés au genre *Lactococcus*.

Par rapport au test de l'ADH, la production d'acétoïne, l'utilisation de citrate et le profil fermentaire des sucres ils ont été subdivisés en espèces et sous-espèces : (Badis., 2004; Dicks *et al.*,1993; Hammes *et al.*, 1992; Holzapfel et Schillinger 1992; Harrigan et Mc Cance, 1976).

Les deux souches V27 et V3, sont ADH-, ne produisent pas d'acétoïne, ne dégradent pas le citrate, ne poussent pas à 4% d'NaCl, poussent à 40°C , fermentent le mannitol, le D-xylose, ne fermentent pas le raffinose ni le ribose. ces souches peuvent s'apparenter à *Lactococcus lactis* subsp.*Cremoris* (Badis *et al* 2014 ; Guessas et Adjoudj., 2012 ; HadeF, 2012).

Certaines isolats sont ADH+, ne produisent pas l'acétoïne, ne réduisent pas le citrate poussent à 40°C résistent à 4% de NaCl,leur profil fermentaire montre que ces souches fermentent majoritairement le ribose, mannitol, lactose, amidon, maltose, fructose, saccharose ne fermentent pas le rhamnose et le sorbitol. Ces isolats appartenant à l'espèce *Lc. Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Sharpe, 1979 ; Schleifer *et al.*, 1985 ; Barlows *et al.*,1991).

Les isolats V31, V9, V25 fermentent l'arabinose et le mannitol et ne fermentent pas le ribose, le sorbitol et le raffinose, ils sont capables de métaboliser le citrate. Ces souches appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Badis, 2004 ; Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al* .,2004 ; Lee *et al.*,2006).

Certaines isolats aussi n'hydrolysent pas l'arginine et produisent le citrate, résistent à une concentration de NaCl 4% et une température de 40°C, fermentent le raffinose et ne fermentent pas le sorbitol, peuvent s'apparenter à *Lactococcus raffinolactis* (Badis *et al.*, 2004) (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*,2006).

Les trois souches V27, V6, V10 n'hydrolysent pas l'arginine et produisent de l'acétoïne réduisent le citrate, fermentent le maltose et pas le sorbitol, lactose, amidon, fructose, l'arabinose, raffinose Ces isolats peuvent s'apparenter à *Lactococcus. plantarum* (Badis *et al.*, 2004) (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*,2006).

Guessas et Kihal, 2004, ont identifié les bactéries lactiques du lait de chèvre des zones arides et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles où *Lactococcus* sp. A présenté le pourcentage le plus élevé (76.16%), suivi de *Streptococcus* (14.78%) et de *Leuconostoc* (8.6%).

Par ailleurs, on remarque que Badiset *al.* , 2004 ont isolé plus de 75 % de coques lactiques à partir du lait cru de chèvre.

Cette prédominance des coques lactique par rapport aux bacilles dans le lait cru de chèvre a été déjà mise en évidence dans Les travaux de Badis *et al.*, (2005) effectués sur le lait cru de chèvre de deux populations caprines Algériennes (Arabia et Kabyle), ont montré que les genres *Leuconostoc* (32.64%) et *Lactococcus* (31.02%) dominant la population Arabia.

A lumière de ces résultats les caractéristiques et les phénotypes qui caractérisent les isolats. semblent similaire a ceux décrit par (Badiset *al.*, 2004).

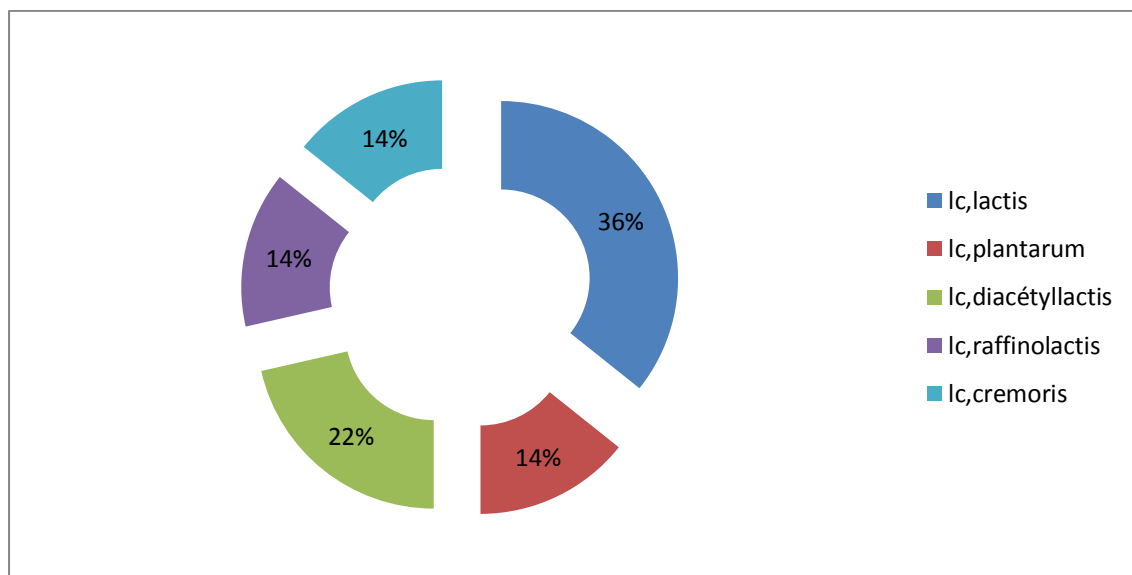


Figure 35: Distribution des espèces de *lactococcus* selon le nombre des souches en résultats.

Conclusion

L'isolement des espèces de bactéries lactiques à partir de deux échantillons de lait cru de chèvre issu de la région de Sidi Belabbes (Ténira) et de Mostaganem (Masra) s'est révélé intéressant.

L'identification des différentes souches a montré une assez importante diversité d'espèces.

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus ne sont plus discutables, produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme.

Parmi les espèces des lactocoques on a réussi à isoler *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Les souches isolées ont une très bonne activité protéolytique qui pourront être exploitées en industries laitière dans l'affinage de certains fromages.

Enfin, notre étude ne représente qu'un début à des études plus approfondies pour plus de performance.

Perspectives

Une identification génétique pour compléter l'identification biochimique et physiologique en utilisant les différentes méthodes disponibles.

L'étude de la cinétique de nos souches pour qu'elles puissent être utilisées en industrie alimentaire.

L'étude du potentiel probiotique de nos souches « in vivo » et « in vitro ».