

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES Sciences Alimentaires

## Mémoire de fin d'études

Présenté par

**HADDAD yasmina**

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences Alimentaires

Spécialité : Nutrition et Pathologies.

Thème

***Résistance de souches bactériennes isolées de lait  
d'ânesse aux hostilités digestives simulées in  
vitro.***

Soutenu publiquement le 7/07/2019

Devant le Jury

|              |                |     |               |
|--------------|----------------|-----|---------------|
| Président    | Mme S. Keddari | MCA | U. Mostaganem |
| Promoteur    | Mr A. RIAZI    | Pr  | U. Mostaganem |
| Examinatrice | Melle I. YAHLA | MCB | U. Mostaganem |

*Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)*

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents pour leur affection et leur amour, leur soutien, pour tout ce qu'ils m'ont appris, pour m'avoir guidée tout au long de ma vie et pour m'avoir permis de m'instruire. Je leur souhaite longue vie et beaucoup de bonheur.*

*Je dédie également ce travail à mon frère YASINE que j'admire, à mes sœurs bien aimées Dehia, Nedjma et Loubna ; à mes amis Yacine, Farid et Abdallah et mes copines Nadia, Chahrazad, Manel, Amel et Tinhinane que j'aime et qui sont mes anges gardiens ; à ma tante adorable Salwa et sa fille la princesse Serine, à mes grands parents ; à mes oncles et mes tantes Chahinez et Meryam ; à toute ma famille ; ainsi qu'à toute la promotion de BAC 2014/2015 et tous ceux avec qui j'ai passé de très bons moments et que j'estime beaucoup.*

*Yasmine Haddad,*

*Mostaganem le 30 Juin 2019*

### **Avant propos**

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem sous la direction scientifique du Professeur Ali Riazi et la supervision technique de Mme Djahira Hamed, ingénieure en chef du LMBAFS. L'identification moléculaire des souches lactiques par la méthode MALDI TOF a été effectuée au Centre de Recherche « CRAPC » de Bou-Ismaïl (wilaya de Tipaza).*

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements et ma reconnaissance à Mr Ali Riazi, professeur à l'université de Mostaganem et directeur du LMBAFS, pour ses enseignements en master de Nutrition et Pathologies, pour m'avoir proposé ce sujet original de microbiologie sur le lait d'ânesse, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour ses précieux conseils et orientations scientifiques qui m'ont toujours rassuré quant à l'aboutissement de ce modeste travail qui restera ma première initiation à la recherche scientifique.*

*Mme Djahira Hamed, l'ingénieur en chef du laboratoire LMBAFS, a joué un rôle majeur dans la réalisation pratique de ce mémoire. Je voudrais qu'elle trouve ici à travers ces mots toute ma reconnaissance et mes vifs remerciements pour avoir supervisé cette expérience dans sa totalité. Je la remercie également pour la formation pratique qu'elle m'a assurée.*

*J'adresse mes remerciements et ma gratitude au Dr Soumia Keddari, Maître de conférences classe A de l'université de Mostaganem pour avoir accepté de présider mon jury d'examen.*

*Je suis très heureuse que le Dr Imene Yahla, Maître de conférences classe B de l'université de Mostaganem aie accepté de faire partie de mon jury, je la remercie infiniment pour ses enseignements, sa disponibilité et les critiques qu'elle pourra apporter et qui valoriseront sans aucun doute ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem.*

*Je remercie aussi ma famille pour m'avoir soutenu durant toutes mes études.*

*Yasmine Haddad,*

*Mostaganem le 30 Juin 2019*

## Résumé

L'objectif de ce travail a été de caractériser des souches lactiques isolées à partir du lait d'ânesse en les identifiant et en testant leur pouvoir de croissance (à différentes concentrations de sel et différentes températures) et leur capacité de résistance aux hostilités digestives simulées in vitro en guise de critère d'éligibilité au statut « probiotique ». Les résultats obtenus ont montré que les neuf souches lactiques isolées à partir du lait d'ânesse utilisées dans ce travail continuent de croître à 10, 45 ou 63.5°C et en présence de 2, 4 et 6.5% (P/V) de NaCl. Elles affichent également une capacité de résistance différentielle selon la souche considérée aux conditions du tube digestif simulées par l' $\alpha$ -amylase salivaire, l'acidité et le suc gastrique, les sels biliaires, le lysozyme et les enzymes pancréatiques (pancréatine, lipase, amylase et protéases). Ainsi, les souches sont, au début, sensibles à l' $\alpha$ -amylase salivaire mais reprennent de la croissance après les premières 30min d'exposition. Toutes les souches sont freinées dans leur croissance par l'acidité gastrique simulée à des niveaux compris entre 25 et plus de 40%. Il y a eut 2 souches (S1 et S2) sur les 9 testées dont la survie aux sels biliaires et au lysozyme a été significativement ( $p < 0.05$ ) réduite de 35%. L'exposition des souches lactiques pendant 5h aux enzymes pancréatiques n'a pas beaucoup altéré leur survie dont la plus faible (aux environs de 80%) a été enregistrée pour les souches S1, S3 et S7 ; alors que d'autres souches ont maintenu leur croissance et affiché des taux de survie supérieurs à 100%. C'est la souche S8 qui a le plus résisté aux protéases. Sur l'ensemble des tests de survie aux hostilités digestives réalisés, les souches S5 et S8 se sont révélées les plus résistantes aux conditions du tube digestif et c'est pourquoi elles ont été choisies pour subir une identification moléculaire par MALDI TOF qui a révélé qu'elles appartiennent au genre *Enterococcus*. L'analyse des spectres de masse au MALDI TOF nous a montré que les deux souches (S5 et S8) appartiennent toutes les deux à une même espèce qui est l'espèce *faecium* avec des Scores de 2.40 pour S5 et 2.36 pour S8.

**Mots clés** : lait d'ânesse, bactéries lactiques, résistance, hostilités digestives, probiotique.

## SUMMARY

The aim of this work was to characterize lactic strains isolated from donkey milk by identifying them and testing their growth potential (at different salt concentrations and different temperatures) and their ability to withstand in vitro simulated digestive hostilities as a criterion for eligibility for "probiotic" status. The results obtained showed that the nine lactic strains isolated from the donkey milk used in this work keep growing at 10, 45 or 63.5 °C and in the presence of 2.4 and 6.5% (w / v) NaCl. They also display a differential resistance capacity depending on the strain type under the conditions of the digestive tract simulated by salivary  $\alpha$ -amylase, acidity and gastric secretion, bile salts, lysozyme and pancreatic enzymes (pancreatin, lipase, amylase and proteases). Thus, the strains are initially sensitive to salivary  $\alpha$ -amylase but recover growth again after the first 30 minutes of exposure. All strains are slowed in their growth by simulated gastric acidity at levels between 25 and more than 40%. There were 2 strains (S1 and S2) out of 9 tested whose bile salt and lysozyme survival was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced by 35%. Exposure of lactic acid strains for 5 hours to pancreatic enzymes did not significantly alter their survival, the lowest (around 80%) was recorded for strains S1, S3 and S7 whereas other strains kept growing giving rise to more than 100% of survival. It is the S8 strain that has the most resistance to proteases. S5 and S8 strains were the most resistant strains to the digestive tract conditions, and therefore were selected for molecular identification by MALDI TOF, which revealed that they belong to the genus *Enterococcus*. Analysis of the MALDI TOF mass spectra have shown that the two strains (S5 and S8) belong to the same species which is the species *faecium* with scores of 2.40 for S5 and 2.36 for S8.

**Key words :** Donkey milk, lactic acid bacteria, survival, digestive hostilities, Pobiotics.

## Sommaire

Dédicace  
Avant propos  
Résumé en français  
Résumé en Anglais  
Liste des figures et des tableaux  
Liste des abréviations  
Introduction

### **CHAPITRE I : Le Lait d'ânesse : un produit méconnu.**

|  |    |
|--|----|
| I.1. Historique du lait d'ânesse de l'antiquité à nos jours .....                          | 3  |
| I.2. Niveau de production mondiale de lait d'ânesse.....                                   | 5  |
| I.3. La production de lait d'ânesse française.....   | 5  |
| I.4. La lactation chez l'ânesse.....   | 6  |
| I.5. Composition biochimique comparée du lait d'ânesse à d'autres laits de mammifères..... | 7  |
| I.5.1. Les caséines et les protéines de lactosérum .....                                   | 8  |
| I.5.2. Graisse et acides gras.....   | 10 |
| I.5.3. Lactose.....  | 10 |
| I.5.4. Composition en vitamines.....   | 10 |
| I.5.5. Composition en minéraux.....  | 13 |
| I.5.6. Les biopeptides bioactifs du lait d'ânesse.....                                     | 14 |
| I.6. Les effets bénéfiques du lait d'ânesse.....   | 14 |
| I.6.1. Substitut au lait de vache responsable d'allergies chez le nourrisson.....          | 14 |
| I.6.2. Effets anti-tumoral et antiviral.....   | 15 |
| I.6.3. Effet antimicrobien.....  | 16 |
| I.6.4. Effet immunomodulateur.....   | 17 |
| I.6.5. Effet anti-inflammatoire.....   | 17 |
| I.7. Caractéristiques microbiologiques du lait d'ânesse.....                               | 17 |
| I.8. Propriétés technologiques du lait d'ânesse.....                                       | 18 |
| I.8.1. Inaptitude à la fabrication de fromage.....   | 18 |
| I.8.2. Aptitude à la fermentation.....   | 18 |
| I.8.3. Congélation et valeur nutritive du lait d'ânesse.....                               | 19 |

|  |    |
|--|----|
| I.8.4. Lyophilisation et lait d'ânesse en poudre.....    | 19 |
| I.8.5. Pasteurisation et lait d'ânesse en bouteille..... | 19 |

## **CHAPITRE II. Matériels et Méthodes**

|  |    |
|--|----|
| II.1. Matériel biologique : origine des souches.....   | 21 |
| II.2. Méthodes.....  | 21 |
| II.2.1. Revivification des souches.....  | 21 |
| II.2.2. Recherche de la catalase.....  | 21 |
| II.2.3. Identification génétique des souches.....  | 22 |
| II.2.3.1. Identification au MALDI TOF.....   | 22 |
| II.2.3.2. Lecture des résultats.....   | 23 |
| II.2.4 Croissance des souches dans différentes concentrations en NaCl, à pH 9.8 et à<br>différentes températures.....                      | 24 |
| II.2.5. Résistance des souches à l' $\alpha$ -amylase salivaire .....  | 24 |
| II.2.6. Résistance des souches aux conditions gastro-intestinales simulées in vitro.....   | 24 |
| II.2.6.1. Préparation de l'inoculum.....   | 24 |
| II.2.6.2. Résistance aux conditions gastriques simulées.....   | 25 |
| II.2.6.3. Résistance des souches isolées aux conditions intestinales simulées (sels<br>biliaires : 0.05 g/ L et lysozyme : 0.1 g / L)..... | 27 |
| II.2.6.4. Résistance des souches isolées aux conditions pancréatiques simulées.....  | 27 |
| II.3. Analyse statistique.....   | 29 |

## **CHAPITRE III Résultats et discussion**

|  |    |
|--|----|
| III.1. Caractéristiques morphologiques et culturales des souches étudiées.....                   | 30 |
| III.1.1 Caractères morphologiques des souches étudiées .....                                     | 30 |
| III.1.2. Caractères culturaux des souches lactiques étudiées .....                               | 31 |
| III.2. Résistance des souches lactiques isolées aux hostilités digestives simulées in vitro..... | 32 |
| III.2.1 Résistance à l' $\alpha$ - amylase salivaire.....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| III.2.2. Résistance des souches lactiques isolées aux conditions gastro-intestinales simulées in Vitro.....   | 33 |
| III.2.2.1. Résistance des souches lactiques isolées dans un modèle gastrique simulé in vitro à pH 2.....  | 33 |
| III.2.2.2. Résistance des souches lactiques isolées aux conditions intestinales simulées in vitro (0.05g de sels biliaires/L et 0,1g de lysozyme/L).....      | 34 |
| III.2.3. Résistance des souches isolées aux conditions du fluide pancréatique simulées in vitro.....  | 35 |
| III.3. Identification au MALDI TOF /MS des deux souches isolées les plus performantes aux tests de croissance et de résistance aux hostilités digestives..... | 36 |
| Conclusion.....   | 39 |
| Références bibliographique.....   | 40 |

## Liste des figures

| <b>Figure</b>    | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|------------------|--|-------------|
| <b>Figure 1</b>  | L'allaitement des enfants au pis de l'ânesse, L'étable de la Nourricerie Parrot, vue de l'intérieur. » de F. Haenen, 1883 (d'après Lauzier, 2011). | <b>3</b>    |
| <b>Figure 2</b>  | Comparaison de la mortalité infantile selon le type de lait utile pour nourrir les enfants syphilitique (d'après Lauzier 2011)                     | <b>4</b>    |
| <b>Figure 3</b>  | Vente de lait dans les rues de Toulouse (BAILLET, 1888).....   | <b>4</b>    |
| <b>Figure 4</b>  | propriété fonctionnelle de lait d'ânesse (Miranda, G et Mahé, MF et al 2004)   | <b>15</b>   |
| <b>Figure 5</b>  | Le principe de l'identification par MALDI TOF  | <b>24</b>   |
| <b>Figure 6</b>  | préparation d'enzyme d' $\alpha$ -amylase salivaire  | <b>26</b>   |
| <b>Figure 7</b>  | préparation d'inoculum   | <b>27</b>   |
| <b>Figure 8</b>  | Méthode de spots (Guiraud, 2012)   | <b>27</b>   |
| <b>Figure 9</b>  | Technique de dilution et de dénombrement par des spots (Guiraud, 2012)   | <b>29</b>   |
| <b>Figure 10</b> | préparation de la solution enzymatique (lysozyme)  | <b>29</b>   |
| <b>Figure 11</b> | préparation pharmaceutique Creon®(complexe enzymatique)  | <b>30</b>   |
| <b>Figure 12</b> | Coloration de Gram de différentes souches testées  | <b>32</b>   |
| <b>Figure 13</b> | Effet de l' $\alpha$ - amylase salivairesur la viabilité des souches testé   | <b>34</b>   |
| <b>Figure 14</b> | Taux de survie des souches testés au suc gastrique à pH=2  | <b>35</b>   |
| <b>Figure 15</b> | Taux de survie des souches testés aux conditions intestinales simulées (0.05 g/ L de sel biliaire et 0,1 g / L lysozyme)                           | <b>37</b>   |
| <b>Figure 16</b> | Taux de survie des souches testés dans fluide pancréatique simulées  | <b>38</b>   |
| <b>Figure 17</b> | <b>Figure 17</b> : Profils de spectre S8   | <b>39</b>   |
| <b>Figure 18</b> | <b>Figure 18</b> : Profils de spectre S8   | <b>40</b>   |

### Liste des tableaux

| <b>Tableau</b>   | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|------------------|--|-------------|
| <b>Tableau 1</b> | Quantité moyenne de lait (en kg) produite par ânesse selon la saison de mise bas (Polidori <i>et al.</i> , 2009)   | <b>6</b>    |
| <b>Tableau 2</b> | Composition biochimique du lait d'ânesse (Gaucheron <i>et al.</i> , 2011, Salimei <i>et al.</i> , 2012, Guo <i>et al.</i> et 2007 et Aspri <i>et al.</i> , 2017)                 | <b>7</b>    |
| <b>Tableau 3</b> | Composition de la caséine et des protéines de lactosérum avec teneur en azote non protéique et taille des micelles de caséine dans différents types de lait (Uniacke-Lowe, 2010) | <b>9</b>    |
| <b>Tableau 4</b> | Composition en acides gras de différent lait (Salimei, 2012 et Tafaro, 2007, Uniacke-Lowe, 2011)   | <b>11</b>   |
| <b>Tableau 5</b> | Concentration en vitamines du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache (Aspri <i>et al.</i> , 2017; Salimei and Fantuz, 2012 et Uniacke-Lowe <i>et al.</i> , 2010)            | <b>12</b>   |
| <b>Tableau 6</b> | Concentration en minéraux du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache (Aspri <i>et al.</i> , 2017; Fantuz <i>et al.</i> , 2012 et Salimei et Fantuz, 2012)                    | <b>13</b>   |
| <b>Tableau 7</b> | Résultats des tests Catalase, oxydase, de température, pH, NaCl et Thermorésistance des souches isolées  | <b>33</b>   |
| <b>Tableau 8</b> | Identification de la souche S5 et S8 par MALDI-TOF/MS avec le score  | <b>39</b>   |

---

### Lises des abréviations

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| <b>APLV</b>   | Alergié au proteins de laity de vache |
| <b>ADN</b>    | Acide désoxyribonucléique             |
| <b>AGS</b>    | Acide Gras Saturé                     |
| <b>UHT</b>    | Ultra haut temperature                |
| <b>Ig</b>     | Immunoglobuline                       |
| <b>AGPI</b>   | Acide gras poly insaturé              |
| <b>AG</b>     | Acide Gras                            |
| <b>Nd</b>     | Non déterminé                         |
| <b>FAO</b>    | Food and Agriculture Organization     |
| <b>nq</b>     | Non quantifié                         |
| <b>MRS</b>    | Man, Rogosa et Sharp                  |
| <b>OMS</b>    | Organisation Mondiale de la Santé     |
| <b>PBS</b>    | Phosphate buffered saline             |
| <b>neg</b>    | Neglégeable                           |
| <b>sp</b>     | Sous espèce                           |
| <b>UFC</b>    | Unité Formant Une Colonie             |
| <b>UFC/ml</b> | UFC par Millilitre                    |

---

## **Introduction**

L'âne, *Equus asinus*, est un membre de la famille des équidés. La domestication de l'âne a commencé vers 6000 av. J.-C. dans la Libye actuelle. Au fil des siècles, les ânes se sont répandus en Asie, en Inde, en Amérique du Sud et en Europe. Les ânes ont une durée de vie de 30 à 50 ans et ont historiquement été utilisés pour faire de l'équitation, pour le transport à courte distance et en tant qu'animal de trait. D'autres utilisations comprennent la production de viande (très limitée) dans certains pays et la production laitière (utilisée en nutrition humaine et dans l'industrie cosmétique).

Pendant ce temps, le lait d'ânesse a commencé être utilisé régulièrement dans les maternités et pour nourrir les nourrissons. En outre, jusqu'à la fin du 19<sup>ème</sup> et au début du 20<sup>ème</sup> siècle, le lait d'ânesse était commercialisé pour l'alimentation des orphelins, des nourrissons, des enfants malsains, des personnes malades et des personnes âgées.

La production de lait d'ânesse a toujours existé, elle se développe principalement en Asie et en Europe. En France, 50 exploitations sont recensées comme productrices de lait d'ânesse, 20 d'entre elles sont réunies au sein de l'APLA (Association des Producteurs de Lait d'Ânesse).

Les allergies aux protéines du lait de vache (APLV) observés chez certains individus constituent un problème de santé publique qui a amené de nombreux chercheurs à éviter ce lait de vache et à trouver des laits de substitutions.

Par ailleurs, le lait d'ânesse demeure méconnu chez bon nombre de populations qui gardent dans leur esprit une image négative sur l'espèce asine qui a du mal à être considérée comme source alimentaire ; alors que la viande équine existe dans le commerce algérien.

C'est pour cela que même à ce jour, boire du lait d'ânesse relèverait de l'exception sinon d'un acte insolite suscitant une réprobation sociale certaine. Ceci serait probablement lié à un manque d'informations scientifiques vulgarisées auprès du grand public.

Les recherches visant l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes à partir du lait d'ânesse sont peu nombreuses même si le profil microbiologique de ce lait aie été établi.

L'objectif principal du présent travail consiste en l'exploration du contenu microbiologique du lait d'ânesse en vue d'isoler, d'identifier et de caractériser de nouvelles bactéries lactiques présentant un intérêt probiotique susceptible d'être exploité dans le secteur agro-alimentaire, nutritionnel ou diététique.

Le présent mémoire est structuré en trois chapitres présentant successivement l'état des connaissances accumulées sur le sujet, la méthodologie mise en œuvre et les résultats obtenus.

# **Chapitre I**

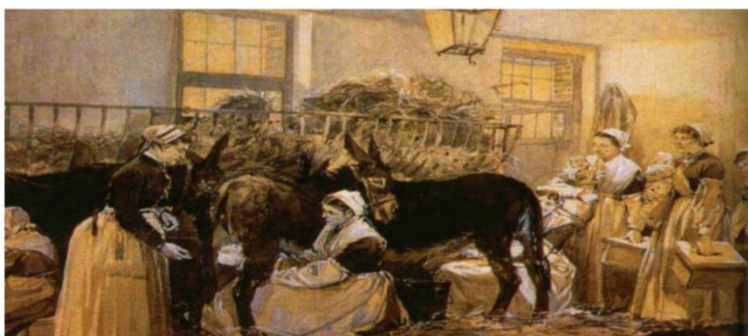
## **Le Lait d'ânesse: un produit méconnu**

## Chapitre I. Le lait d'ânesse : un produit méconnu.

### I.1. Historique du lait d'ânesse de l'antiquité à nos jours :

Le lait d'ânesse est connu comme une découverte miracle depuis l'Antiquité pour ses vertus bienfaisantes. Hippocrate le père de la médecine (460 – 370 av. J-C) le recommandait pour lutter contre différentes pathologies comme les douleurs articulaires, la cicatrisation des plaies ou les occlusions intestinales. De même, dans son ouvrage encyclopédique « Histoire naturelle, livre 28 » dans le chapitre traitant des remèdes tirés des animaux, Pline l'Ancien (23 - 79 apr. J.-C.) le proposait pour combattre la fièvre, la fatigue, les rides du visage, ou les ulcérations (Pline l'Ancien).

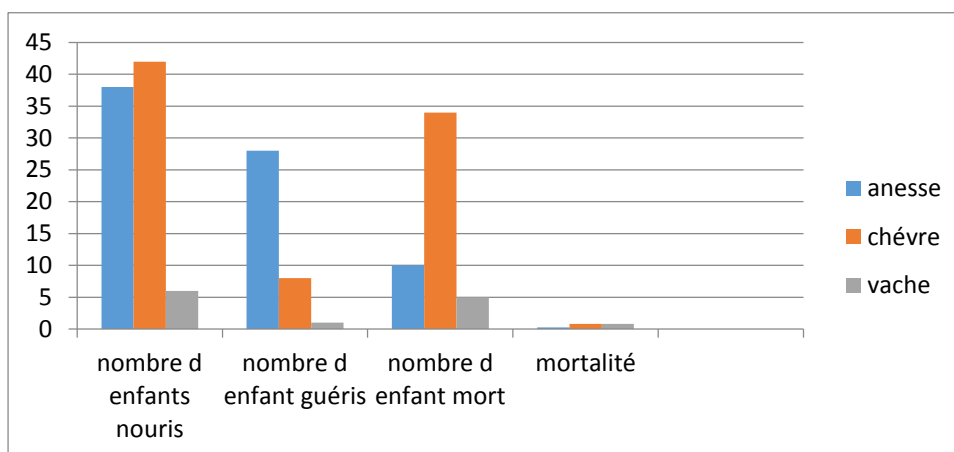
Buffon (1707-1788) mentionne, dans son « Histoire naturelle », les bienfaits généraux du lait d'ânesse : « Le lait d'ânesse est un remède éprouvé et spécifique pour certains maux, et l'usage de ce remède s'est conservé depuis les Grecs jusqu'à nous » Buffon (1788). Au XIX<sup>ème</sup> siècle, il était également courant de nourrir les nouveau-nés non-allaités directement au pis de l'ânesse (fig. 1).



**Figure 1** : L'allaitement des nouveau-nés au pis de l'ânesse, à l'intérieur de l'étable de la nourricerie (Parrot et Haenen, 1883).

Ce fut le cas par exemple dans les années 1880 dans une nourricerie de l'Hospice des Enfants-Assistés à Paris où des laits de vache, de chèvre et d'ânesse ont été essayés par le Professeur Parrot pour nourrir les enfants syphilitiques (Lauzier, 2011)

La comparaison de l'effet de la consommation de lait d'ânesse par rapport au lait de vache et de chèvre sur le taux de mortalité d'enfants atteints de syphilis a montré qu'avec le lait d'ânesse on obtenait un taux de guérison extraordinaire. Une meilleure survie a été obtenue avec le lait d'ânesse par rapport au lait de chèvre et de vache avec une mortalité



**Figure 2:** Comparaison de la mortalité infantile selon le type de lait utilisé pour nourrir les enfants syphilitiques (d'après Lauzier, 2011).

En France, et plus précisément à Toulouse, il existait un établissement en ville dédié à des ânesses laitières de race gasconne en lactation, et un autre à la campagne, pour l'élevage des ânonnes et des femelles futures productrices (fig. 3). Une tournée journalière était alors organisée en ville pour la vente de lait d'ânesse (Baillet, 1888).



**Figure 3 :** Vente de lait dans les rues de Toulouse (Baillet, 1888).

Une meilleure survie a été obtenue avec le lait d'ânesse avec une mortalité moindre et un nombre d'enfants guéris considérablement élevé par rapport aux laits de vache et de chèvre (fig. 2) (Lauzier, 2011).

## **I.2. Niveau de production mondiale de lait d'ânesse**

D'après la FAO (2017), la Chine est l'un des pays qui en 2014 comptait le plus de têtes d'ânesses dans le monde avec 6 033 500 derrière l'Éthiopie (7 428 037 animaux) et devant le Pakistan (500 bêtes). Toutefois, peu de données sur la production de lait d'ânesse en Éthiopie ou au Pakistan sont disponibles. Dans le Nord-est de la Chine, dans les provinces de Xinjiang et Shanxi, la production annuelle de lait d'ânesse atteint les 40 000 tonnes de lait, plaçant la Chine au 1er rang mondial (Guo *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2006).

L'entreprise chinoise d'agroalimentaire « YuKunLun » créée en 2007 contribue fortement à la production chinoise de lait d'ânesse. L'entreprise dispose d'une chaîne de production permettant de fabriquer 20 tonnes de lait d'ânesse en poudre lyophilisée et 500 tonnes de lait frais par an, destinées à la consommation humaine notamment en tant que substitut au lait maternel (Zhang Ming et Yukunlun, 2015).

En Amérique du Sud, le Chili se démarque avec la société « Donkey milk Farm », qui exporte ses produits cosmétiques à base de lait d'ânesse aux États-Unis, au Japon, en Allemagne au Canada et en Argentine.

En Europe, l'Italie avec ses 24 900 animaux assure la plus forte production de lait d'ânesse, grâce à l'entreprise « Eurolactis » créée en 2007 qui produit 52000 litres de lait d'ânesse par an, en s'appuyant sur un millier d'ânesses. Eurolactis a fait le choix de commercialiser ce lait sous plusieurs formes, notamment cosmétique et alimentaire. Eurolactis est partenaire d'un important programme de recherche, financé par la Communauté Européenne, destiné à assurer l'alimentation et la survie des grands prématurés. Une étude clinique actuelle portant sur 168 prématurés et réalisée au Département de néonatalogie Santa Anna de l'Hôpital Regina Margherita de Turin est en cours (Eurolactis, 2017).

## **I.3. La production française de lait d'ânesse**

En France, le nombre estimé d'ânes est de 82 000 individus appartenant à 7 races répertoriées (INAM, 2014). Aujourd'hui, on compte 60 producteurs de lait d'ânesse (fig. 4). Concernant la valorisation du lait d'ânesse en France, selon l'observatoire économique et social INAM (2014), les produits finis commercialisés par les éleveurs d'ânesses laitières sont de trois types : cosmétique, lait frais et lait lyophilisé.

Pour la fabrication de cosmétiques ou de gélules, certains éleveurs transforment eux-mêmes le lait tandis que d'autres font appel à un laboratoire ou à un artisan indépendant. Les produits sont distribués par divers moyens : vente directe à la ferme, internet, magasin de producteurs, marchés ou intermédiaires.

Autrefois très utilisé, le lait d'ânesse a été oublié un temps pour revenir aujourd'hui sur le devant de la scène avec de nombreuses applications possibles. La recherche scientifique s'intéresse de plus en plus à cette matrice alimentaire, qui par sa composition biochimique et microbiologique, représente un intérêt nutritionnel et santé grandissant pour l'homme.

#### **I.4. La lactation chez l'ânesse**

Il est possible d'avoir du lait toute l'année, car l'ânesse peut mettre bas à n'importe quel moment de l'année ; toutefois, c'est avec les mises-bas d'hiver et d'été que le meilleur rendement est obtenu, comme le montre le tableau 1 (Polidori et al., 2009).

**Tableau 1:** Quantité moyenne de lait (en kg) produite par ânesse selon la saison de mise bas ( Polidori et al., 2009).

| Saisons               | Automne | Hiver | Printemps | Eté |
|-----------------------|---------|-------|-----------|-----|
| Quantité de lait (kg) | 447     | 600   | 392       | 517 |

La réserve de lait dans la mamelle est principalement alvéolaire. Elle ne permet pas un grand stockage et nécessite une libération d'ocytocine importante pour assurer la vidange de la mamelle (Salimei, 2011). Pour cela, il faut que l'ânon soit à proximité de sa mère. Dans la littérature, les ânon sont séparés physiquement de leurs mères 3 h avant la traite mais restent toujours en contact visuel. Tous les auteurs et éleveurs sont d'accord sur le fait que le lait du premier mois doit être entièrement consacré à l'ânon. En effet, cela permet de lui assurer un bon développement pour la suite. De plus, comme la lactation est très dépendante de la présence de l'ânon, si celui-ci meurt, la lactation s'arrête. Le sevrage se fait généralement quand l'ânon a entre 6 et 7 mois mais, selon les pratiques d'élevage, il peut se faire plus tard.

### I.5. Composition biochimique comparée du lait d'ânesse à d'autres laits de mammifères.

Le lait d'ânesse, comparé au lait de vache, a un pH neutre ou légèrement alcalin (7 à 7.2) (tableau 2), tout comme le lait maternel humain. La teneur en protéines totales du lait d'ânesse (1,5 - 1,8 g / 100 g) est proche de celle du lait humain (0,9 - 1,7 g / 100 g) ; mais nettement plus faible que celle du lait de vache (3,1 - 3,8 g / 100 g).

**Tableau 2** : Composition biochimique du lait d'ânesse (Gaucheron et al., 2011, Salimei et al., 2012 ; Guo et al., 2007 et Aspri et al., 2017)

|                            | Lait d'ânesse | Lait de femme | Lait de vache |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| PH                         | 7 – 7.2       | 7 – 7.5       | 6.6-6.8       |
| Matière solide             | 8.8 – 11.7    | 12.5 – 13     | 11.7          |
| Energie (kj/Kg)            | 1719          | 2680          | 2883          |
| Lactose (g/100g)           | 5.8 – 7       | 6.3 – 7       | 4.4 – 4.9     |
| Lipide (g/100g)            | 0.3 – 1.8     | 3.5 – 4.0     | 3.5 – 3.9     |
| Protéines totales (g/100g) | 1.5 – 1.8     | 0.9 – 1.7     | 3.1 – 3.8     |
| Caséine (g/100g)           | 0.6 – 1       | 0.3 – 0.4     | 2.4 – 2.8     |
| Matière grasses (g/100g)   | 0.29 – 1.82   | 3.5 – 4       | 3.5 – 3.9     |
| Lactosérum (g/L)           | 0.49 – 0.80   | 0.68 – 0.83   | 0.55 – 0.70   |

La fraction protéique du lait d'ânesse est riche en protéines de lactosérum, qui représentent 35 - 50% de la fraction d'azote, tandis que dans le lait bovin, ils ne représentent

que 20%. Le rapport entre les caséines et les protéines sériques est de 52:37 et varie entre les limites les plus élevées pour le lait de vache (Guo et Serrement, 2007)

### **I.5.1. Les caséines et les protéines de lactosérum**

Le lait d'ânesse est un lait pauvre en matières azotées, tout comme le lait de femme, où la matière azotée ne représente que 20% de la matière sèche contre 80% dans le lait de vache (Salimei et Fantuz, 2012). Les caséines représentent 40 à 50% de la matière azotée du lait d'ânesse. Les protéines du lait d'ânesse et leurs fractions comparées à celles du lait de vache et de femme sont présentées dans le tableau 3.

Le taux de caséines du lait d'ânesse est plus faible que celui du lait de vache (80%), mais reste similaire au lait maternel humain (Guo et al 2007. ; Polidori et Vincenzetti, 2012). L'ensemble de ces données suggèrent que le lait d'ânesse possède une meilleure digestibilité pour l'homme que le lait de vache. Les connaissances disponibles sur les caséines du lait d'ânesse sont limitées, contrairement aux espèces laitières conventionnelles.

Une combinaison de méthodes d'électrophorèse, de chromatographie et de protéomique a permis d'identifier quatre types de caséines ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et kcaséine). La distribution des caséines du lait d'ânesse montre que la caséine  $\beta$  est la forme prédominante, suivie de l' $\alpha_1$  puis de l' $\alpha_2$  qui apparaissent comme des composants mineurs (Chianese *et al.*, 2010, Polidori et Vincenzetti, 2012-2016).

Les protéines solubles dans le lait d'ânesse représentent 40 à 50% de la matière azotée, en comparaison au lait maternel humain ou au lait de vache où elles représentent respectivement 18% et 66% de la matière azotée. Ainsi, le rapport protéines solubles/caséines du lait d'ânesse est proche de 1 alors qu'il est de 0,2 pour le lait de vache et de 2 pour le lait de femme. Les protéines solubles sont principalement représentées par l' $\alpha$ -lactalbumine, la  $\beta$ -lactoglobuline et le lysozyme. Des composants mineurs comme la sérum albumine, la lactoferrine et les immunoglobulines y ont également été décrits (Carminati et Tidona, 2017).

**Tableau 3:** Teneurs en protéines totales, différentes caséines, protéines de lactosérum, azote non protéique et taille des micelles de caséine dans différents type de lait (Uniacke-Lowe 2010)

| Protéines (g/kg)          | Lait d'ânesse | Lait de vache | Lait humain |
|---------------------------|---------------|---------------|-------------|
| Protéines totales         | 7.8           | 26            | 2.4         |
| $\alpha$ 1s-caséine       | ND            | 10.7          | 0.7         |
| $\alpha$ 2s-caséine       | ND            | 2.8           | ND          |
| k-caséine                 | ND            | 3.1           | 0.4         |
| $\beta$ -lactoglobuline   | 3.3           | 3.2           | ND          |
| $\alpha$ –lactalbumine    | 1.9           | 1.2           | 2.5         |
| Albumine sérique          | 0.4           | 0.4           | 0.48        |
| Protéose peptone          | -             | 0.8           | ND          |
| Immunoglobulines          | 1.3           | 0.8           | 0.96        |
| IgE1.2                    | ND            | 0.65          | 0.03        |
| IgA                       | ND            | 0.14          | 0.96        |
| Lactoferine               | 0.37          | 0.10          | 1.65        |
| Lysozyme                  | 1             | ND            | 0.34        |
| Azote Non Protéique (ANP) | 455           | 266           | 454         |

ND = non déterminé

### **I.5.2. Graisse et acides gras**

La teneur en matière grasse du lait d'ânesse varie de 0,28 % à 1,82% (Guo et Serrement, 2007) et se caractérise par un taux élevé d'acides gras essentiels et d'acides gras peu saturés (AGPS) (Gastaldi *et al.*, 2013) (tableau 4).

Les acides gras saturés (AGS) sont les acides gras les plus représentés dans la fraction lipidique. La teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI)  $\omega 3$  est élevée (7,4 - 13,7 g / 100 g d'AG), mais s'équilibre avec la quantité d'AG polyinsaturés  $\omega 6$  (8,6 - 12,3 g / 100 g d'AG), conduisant à un ratio  $\omega 3 / \omega 6$  proche de 1. Les acides linoléique (C18 :3  $\omega 3$ ) et linoléique (C18 :2  $\omega 6$ ) sont les AGPI les plus représentés.

De plus, la présence de traces d'AGPI dits mineurs, comme l'acide eicosadiénoïque et l'acide arachidonique, mais essentiels dans le développement néonatal, ont été retrouvés dans le lait d'ânesse dans différentes études (Chiofalo, 2001, Salimei *et al.*, 2004). Les variations en teneur et en type des AGPI dépendent de la race de l'ânesse et de la nature de son alimentation (Alabiso *et al.*, 2009, Chiofalo *et al.*, 2011).

### **I.5.3. Lactose**

La teneur en lactose du lait d'ânesse varie de 6 à 7 g / 100 g et est supérieure à celle du lait de vache (4,4 - 4,9 g / 100 g). Cette teneur élevée en lactose facilite l'absorption intestinale du calcium et du phosphore et favorise le transfert des minéraux dans la structure osseuse, ce qui contribue à prévenir l'ostéoporose (Heaney, 2000). Le lactose est également responsable de la palatabilité du lait d'ânesse. Cependant, cette forte teneur en lactose peut être une contrainte pour les personnes intolérantes au lactose (Salimei *et al.*, 2004a ; Salimei et Fantuz, 2012;).

### **I.5.4. Composition en vitamines**

Le lait d'ânesse est riche en vitamines hydrosolubles et liposolubles (Tafaro *et al.*, 2007). La teneur totale en vitamines du lait varie selon le régime alimentaire de l'ânesse. En effet, les teneurs en vitamines hydrosolubles sont plus impactées que les vitamines liposolubles par le régime alimentaire de l'ânesse en lactation (Claeys *et al.*, 2014). Les taux élevés en

**Tableau 4.** Composition en acides gras de différents laits (Salimei, 2012 ; Tafaro, 2007 ; Uniacke-Lowe 2011)

| Acides gras                     | Lait d'ânesse | Lait de femme | Lait de vache |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| C4 :0 butyrique                 | 0.32 -0.6     | 0.19          | 3.90          |
| C6 :0 caproïque                 | 0,28 - 1,22   | 0.15          | 2.50          |
| C8 :0 caprylique                | 8.52-12.8     | 0.46          | 1.50          |
| C12 :0 laurique                 | 10.67 – 15.9  | 4.4           | 3.60          |
| C14 :1(n-5) myristoleïque       | 0.22 – 0.88   | 0.80          | 0.41          |
| C15 :0 pentadécyclique          | 0.32 – 0.57   | 0.43          | 1.20          |
| C16 :0 palmitique               | 11.47 - 29.17 | 22            | 27.9          |
| C17 :1 heptadécanoïque          | 0.27 – 0.73   | 0.37          | 0.36          |
| C18 :0 stéarique                | 1,12 - 3,91   | 8.06          | 12.20         |
| C18 :1(n-9) oleïque             | 9.7 - 22.15   | 31.30         | 17.20         |
| C18 :3(n-3) $\gamma$ -linoléniq | 6,32- 16.33   | 1.30          | 1.80          |
| C20 :5(n-3) eicosapentanoïque   | 0.27          | 0.12          | 0.09          |
| C22 :6(n-3) docosahexanoïque    | 0.30          | 0.25          | 0.01          |
| AG saturés (% AG totaux)        | 46.7 – 67.7   | 39.41-42.24   | 55.7-72.8     |
| AGMI (% AG totaux)              | 15.3 - 35     | 44.30 – 45.11 | 22.7-30.3     |
| AGPI (n-3) (% AG totaux)        | 9.45 – 9.64   | 1.27 – 2.19   | ND            |
| AGPI (n-6) (% AG totaux)        | 11.57 – 13.09 | 11.17 – 14.1  | ND            |

vitamines présentes dans le lait d'ânesse en fait un excellent aliment avec un effet bénéfique sur la nutrition humaine et la santé (Cunsolo *et al.*, 2011). Les niveaux de vitamines de différents laits sont présentés dans le (tableau 5).

**Tableau 5** : Concentration en vitamines (mg/L) des laits d'ânesse, de femme et de vache (Aspri *et al.*, 2017, Salimei et Fantuz, 2012 et Uniacke-Lowe *et al.* 2010)

| Vitamines (mg/L) | Lait d'ânesse | Lait humain   | Lait de vache |
|------------------|---------------|---------------|---------------|
| Vitamine A       | 0.017         | 0.3 - 0.7     | 0.50          |
| Vitamine B1      | 0.41          | 0.003 - 0.015 | 0.37          |
| Vitamine B2      | 0.64          | 0.4-0.6       | 1.8           |
| Vitamine B3      | 0.74          | 1.7           | 0.9           |
| Vitamine B12     | 1.10          | 0.5           | 0.004         |
| Vitamine C       | 5.7           | 5 -10         | 5-10          |
| Vitamine E       | 0.05          | 3- 8          | 0.98 - 1.28   |

La vitamine B12 (cobalamine), responsable du maintien de cellules nerveuses saines, est présente en concentration beaucoup plus élevée que dans les laits bovin et humain. De plus, d'autres vitamines du groupe B, telles que la thiamine (vitamine B1) et la riboflavine (vitamine B2), sont en concentrations plus élevées que dans le lait de femme. Le lait d'ânesse présente une quantité inférieure en vitamine A et E par rapport au lait bovin et humain. La teneur totale en vitamine C contenue dans le lait d'ânesse (5,7 mg/L) correspond aux apports quotidiens recommandés en vitamine C pour des enfants âgés de 6 à 12 mois.

### I.5.5. Composition en minéraux.

Dans l'ensemble, la composition en minéraux et en oligo-éléments du lait d'ânesse est très proche de celle du lait de la femme. Toutefois, le lait d'ânesse présente des niveaux plus élevés en calcium et en phosphore, avec cependant un rapport Ca/P similaire à celui du lait de femme (tableau 6).

**Tableau 6:** Concentration en minéraux du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache. Composé à partir de (Aspri *et al.*, 2017, Fantuz *et al.*, 2012 et Salimei *et Fantuz*, 2012)

| Minéraux (mg/L) | Lait d'ânesse | Lait humain     | Lait de vache |
|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| Ca              | 330 – 114     | 278             | 122           |
| P               | 320 – 650     | 140             | 119           |
| K               | 240 – 747     | 530             | 152           |
| Na              | 100 – 268     | 180             | 58            |
| Mg              | 40 – 83       | 35              | 12            |
| Fe              | 0,43 – 2,66   | 0,72            | 0,08          |
| Zn 1            | 1,23 – 3,19   | 1 – 3           | 0,53          |
| Cu              | 0,08 – 0,30   | 0,2 – 0,4       | 0,06          |
| Se              | 0,00446       | 0,1 -0,2        | 0,01          |
| Co              | 0,00049       | 0,0001 – 0,0002 | 0,0005        |
| I               | 0,0749        | 0,062           | 0,1 – 0,9     |

Concernant les oligo-éléments essentiels, le lait d'ânesse contient des concentrations similaires en Zinc, Co et I, avec le lait humain, alors que les concentrations en Fe, Cu et Se sont plus faibles. Au cours du premier mois de lactation, le lait est la seule source

Nutritionnelle pour l'ânon, et contient les plus hauts niveaux d'éléments minéraux, favorisant une croissance rapide de l'ânon. Au cours de la lactation, une diminution significative de la composition en minéraux dans le lait en accord avec une réduction de la teneur en caséine est observée. En effet, ces minéraux sont principalement associés aux micelles des caséines (Aspri *et al.*, 2017, Fantuz *et al.*, 2012).

#### **I.5.6. Les biopeptides actifs du lait d'ânesse.**

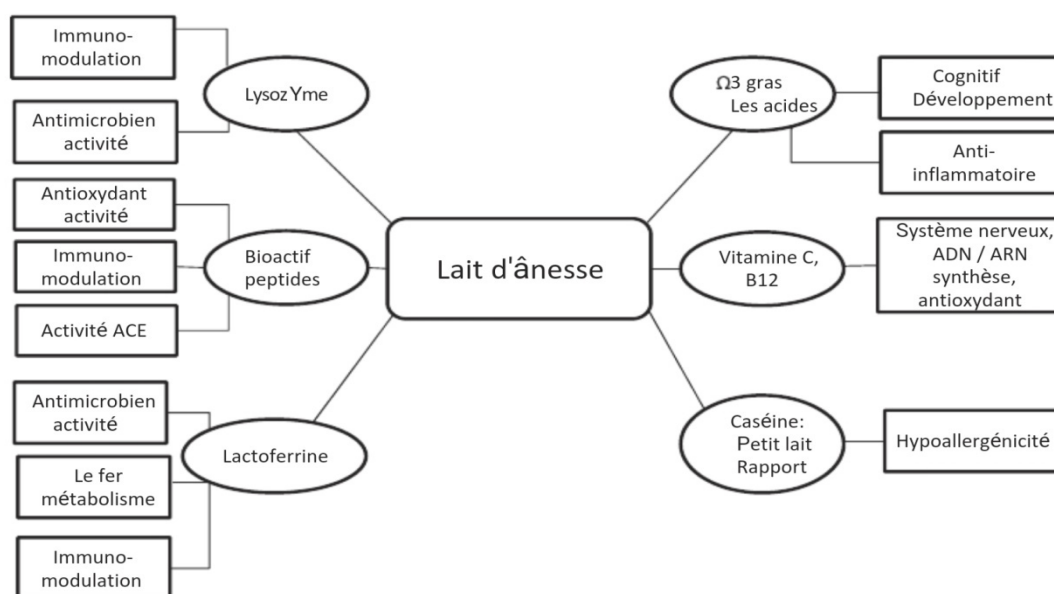
Certains traitements chimiques et physiques du lait d'ânesse permettent la génération d'autres composés biologiquement actifs. L'acidification suivie de l'hydrolyse par la pepsine du lait d'ânesse lui confère la propriété d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (Nazzaro, 2010). Ainsi, le lait d'ânesse est également décrit comme une source de peptides antimicrobiens libérés lors de la digestion *in vitro* (Tidona *et al.*, 2011). L'effet inhibiteur observé est significativement plus élevé pour les échantillons préalablement digérés par rapport aux échantillons de lait cru. Ainsi, l'activité antimicrobienne du lait d'ânesse pourrait résulter d'un effet synergique lié à la synthèse de peptides issus de la dégradation enzymatique gastro-intestinale et aux protéines intactes présentes naturellement dans le lait tel que le lysozyme (Tidona *et al.*, 2011).

#### **I.6. Les effets bénéfiques du lait d'ânesse.**

Une alimentation équilibrée joue un rôle important dans la prévention des maladies et la promotion du bien-être (Martemucci, 2012). Les propriétés thérapeutiques du lait d'ânesse sont connues depuis les temps anciens, mais de nos jours la recherche se concentre sur son aspect nutritif et de santé potentiels (Gubi *et al* 2014).

Le lait est de plus en plus important en Europe, notamment en France, en Italie, en Hongrie et dans les Pays-Bas. Les propriétés fonctionnelles du lait d'ânesse sont reportées à la figure 4.

Le lait d'ânesse, par sa composition microbienne et biochimique est le lait qui ressemble le plus au lait de femme. Plus précisément, le lait d'ânesse et le lait humain ont des teneurs similaires en lactose, en protéines totales et en protéines solubles. Le lait d'ânesse présente un profil nutritionnel homogène particulièrement intéressant et certaines études préconisent son utilisation notamment chez les nourrissons et les personnes âgées (Uniacke *et al.*, 2010).



**Figure 4** : propriétés fonctionnelles du lait d'ânesse (Miranda *et al.*, 2004)

### **I.6.1. Le lait d'ânesse comme substitut au lait de vache responsable d'allergies chez le nourrisson**

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est une réponse immunologique anormale aux protéines de lait de vache chez certains individus. L'APLV, l'une des allergies alimentaires les plus répandues, affecte 2 à 7% des enfants de moins de 6 mois (Polidori and Vincenzetti, 2013a).

La  $\beta$ -lactoglobuline, qui est absente dans le lait maternel, mais présente à des concentrations relativement élevées dans le lait de vache, est responsable de la majorité des allergies au lait. Cependant, d'autres protéines de lactosérum, comme la  $\alpha$ -lactalbumine, l'albumine sérique, la lactoferrine et la caséine, peuvent provoquer des allergies au lait. La caséine du lait de vache est relativement riche en  $\alpha$ 1S-caséine, qui est suggérée être responsable de l'apparition d'allergies (Potočnik et al., 2011).

Les principaux allergènes du lait de vache sont les caséines ( $\alpha$ -1S et  $\beta$ -caséines) suivie de

la  $\beta$ -lactoglobuline (Caffarelli et al., 2010; Muraro et al., 2002; Osman Swar, 2011). La stratégie thérapeutique pour répondre à l'APLV est l'élimination totale du lait de vache et sa substitution par des laits moins allergisants provenant d'autres espèces animales. Le lait sélectionné doit offrir une adéquation nutritionnelle et être hypoallergénique. La faible allergénicité du lait d'ânesse est principalement due à la faible teneur en caséine (Vincenzetti et al., 2008 ; 2014).

De plus, le lait d'ânesse est facilement digéré en raison de sa teneur élevée en protéines solubles (Tidona et al., 2014). Cependant, en raison de la faible teneur en matières grasses du lait d'ânesse, une supplémentation en triglycérides à chaîne moyenne pourraient être envisagée pour augmenter son énergie globale et sa teneur en matières grasses (Salimei and Fantuz, 2012).

Les résultats de l'étude clinique de Iacono et al. (1992) suggèrent que les nourrissons souffrant d'APLV pourraient consommer du lait d'ânesse enrichi en lipides (210-250 mL par kg de poids corporel par jour). Une autre étude *in vivo* démontre que 24 sujets souffrant d'APLV sur 25 ont toléré le lait d'ânesse (96%) (Tesse et al., 2009).

### **I.6.2. Effets anti-tumoral et antiviral.**

Mao et al. (2009) ont démontré des propriétés anti-tumorales et antiprolifératives du lait d'ânesse sur une lignée cellulaire tumorigène humaine issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire (cellules A459). Ces auteurs ont également montré que la fraction du lait d'ânesse qui contenait le lysozyme était plus efficace que les autres fractions de ce même lait (lait écrémé, caséines, lactosérum, protéines du lactosérum de masse moléculaires inférieure ou égale à 10 kDa) pour inhiber la prolifération des cellules tumorales A459.

Ainsi, les protéines solubles joueraient un rôle fondamental dans l'activité anti-proliférative du lait d'ânesse, *in vitro*. Une récente étude menée par Brumini et al. (2013) met en avant une activité antivirale du lait d'ânesse sur l'échovirus (Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus) de type 5, virus à ARN infectant le tractus gastro-intestinal et provoquant des troubles digestifs chez l'homme. En effet, dans leur étude l'infection des cellules épithéliales intestinales Caco-2 par l'échovirus de type 5 est réduite après ajout de lait

d'ânesse. Cette activité anti-virale est majoritairement portée par les protéines solubles (lactoperoxydase, lysozyme, immunoglobuline, lactoferrine, sérum albumine,  $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$ -lactoglobuline), suggérant une activité synergique de ces protéines (Brumini et al., 2013).

### **I.6.3. Effet antimicrobien.**

Le lait d'ânesse contient plusieurs protéines antimicrobiennes, à savoir le lysozyme, la lactoferrine et lactoperoxydase, qui ont la capacité d'inhiber la croissance d'un large spectre de bactéries. En outre, ils ont la capacité de réduire l'incidence des troubles gastro-intestinaux. Infections dans le tube digestif ou en se protégeant contre les infections de la glande mammaire. Le lysozyme est une enzyme présente dans le lait d'ânesse avec deux variantes A et B qui diffèrent par trois acides aminés substitués en différentes positions. Il est pratiquement absent d'autres espèces productrices de lait (vache, chèvre, mouton), tandis que dans le lait maternel, sa concentration se situe entre 0,2 et 0,34 g / L (se référer au tableau 3).

Le lait d'ânesse a été utilisé comme alternative au lysozyme d'œuf dans la fabrication du fromage pour l'inhibition des clostridium formant des spores et provoquant un soufflage tardif dans les fromages à pâte italiens (Cosentino et Paolino 2013, Galassi, et Salimei, 2012). De plus, le lysozyme est un immunomodulateur chez les enfants et un anti-inflammatoire (Salimei et Fantuz 2004, Zhang et Zhao, 2008).

La lactoferrine est une protéine qui se lie au fer et agit comme un agent antimicrobien en hydrolysant des liaisons glycosidiques de polysaccharides muqueux dans les parois des cellules bactériennes. Sa concentration serait supérieure à celle du lait de vache (tableau 3).

L'isolement d'une souche de *L. paracaseine* productrice de bactériocine à partir du lait d'ânesse a été rapporté par Sa et Krishnaa (2011) et Murua et al. (2013). Cette bactériocine possède des propriétés antimicrobiennes contre plusieurs bactéries pathogènes telles que *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*.

### **I.6.4. Effet immunomodulateur**

*Lactobacillus rhamnosus* est naturellement présent dans le microbiote humain et joue un rôle important de la santé humaine en assurant l'équilibre de la flore intestinale et en

fournissant des informations locales et immunomodulatrices systémiques (Peng *et al.* (2014) ). Ces derniers auteurs ont comparé la fonction immunologique du lait d'ânesse et de *L. rhamnosus* ZDY114 chez la souris, en mettant l'accent sur les facteurs cellulaires, humoraux et non spécifiques à l'immunité. Ils constatent un effet synergique de la bactérie et du lait d'ânesse dans l'amélioration de la fonction immunitaire des souris.

#### **I.6.5. Effet anti-inflammatoire**

La maladie de Crohn est une dysbiose associée à un dysfonctionnement des cellules de Paneth qui produisent moins de peptides antimicrobiens (lysozyme, a-défensines). L'administration de lait d'ânesse enrichi en lysozyme (3.6mg/mL) à un modèle d'iléite induit par l'indométacine chez des souris a permis la réparation des dommages occasionnés au fonctionnement des cellules de Paneth (Jirillo *et al.*, 2010). Le lait d'ânesse, riche en lysozyme, exerce des propriétés anti-inflammatoires en palliant au déficit endogène en peptides antimicrobiens observés lors d'une iléite et en réduisant la dysbiose intestinale.

#### **I.7. Caractéristiques microbiologiques du lait d'ânesse.**

Le lait d'ânesse cru renferme un nombre total de bactéries faible allant de 2.40 à 4.60 log<sub>10</sub> cfu/mL (Cavallarin *et al.*, 2015, Coppola *et al.*, 2002, Malissiova *et al.*, 2016 et Pilla *et al.*, 2010). La raison de cette faible charge microbiologique peut être due au bon bilan de santé des ânes, à l'excellente position anatomique naturelle du pis (Salimei et Fantuz, 2012), ainsi qu'à la présence de composants antimicrobiens naturels, tels que le lysozyme, les immunoglobulines, la lactoferrine et la lactoperoxydase contenues dans le lait d'ânesse (Aspri *et al.*, 2017).

Les bactéries lactiques acides (BLA) du lait d'ânesse ont été très peu étudiées. Selon certains travaux, le contenu de BLA du lait d'ânesse varie entre 1 et 4.2 log cfu /mL (Carminati *et al.*, 2014 , Chiavari *et al.*, 2005, Coppola *et al.*, 2002 et Zhang *et al.*, 2008).. Ces BLA peuvent produire des composés antimicrobiens, tels que des bactériocines ou des substances inhibitrices similaires à la bactériocine (Murua *et al.*, 2013 ; Sa *et al.*, 2011).

#### **I.8. Propriétés technologiques du lait d'ânesse.**

La disponibilité de lait d'ânesse, comme cela a déjà discuté, est assez limitée, et, par conséquent, la préservation et l'extension du stockage est d'une grande importance. Pour le

moment, le lait d'ânesse est disponible dans les pays industrialisés sur le marché sous forme brute (non traité) et pasteurisée (traité thermiquement par UHT). D'autres formes de lait d'ânesse existent (congelé, lyophilisé et en poudre).

### **I.8.1. Inaptitude à la fabrication de fromage.**

En raison de sa composition biochimique, notamment ses faibles teneurs en caséines, le lait d'ânesse est difficilement transformable en fromage.

Cependant, le lait d'ânesse a la capacité de former un faible caillé dans des conditions acides, ce qui permet la formation d'un gel et potentiellement la production de produits de type yaourt. (Chiavari et al., 2005).

### **I.8.2. Aptitude à la fermentation**

Le lait d'ânesse est fermenté en produits du type yaourt avec des propriétés probiotiques et thérapeutiques. Le seul produit fermenté de lait d'ânesse connu et disponible sur le marché est le koumiss (Kumys), largement consommé en Russie, Mongolie et au Kazakhstan, principalement pour sa valeur thérapeutique et nutritive.

Le koumiss était traditionnellement fabriqué à partir de lait d'ânesse cru fraisensemencé avec un mélange de bactéries (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*) levures (*Saccharomyces* et *Candida*) qui le fermentent pendant 3 à 8h dans un sac en cuir appelé « tourbillon ». Le niveau d'acidification et la teneur en alcool générés par la fermentation sont contrôlés par addition de lait cru (Uniacke-Lowe, 2011). Cependant, la production de laits fermentés au moyen d'un protocole de fabrication normalisé devrait être considéré comme cruciale pour les consommateurs et le marché (Di Cagno *et al.*, 2004)

### **I.8.3. Congélation et valeur nutritive du lait d'ânesse**

L'entreposage du lait d'ânesse à -20°C pendant 2 ou 3 mois n'empêche pas la dégradation des caséines, du contenu en protéines totales et la diminution du taux de vitamine C ; alors qu'il préserve l'activité et la quantité de lysozyme, ainsi que la stabilité de la concentration en  $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$  lactoglobuline (Vincenzetti et al., 2011 ; Polidori et Vincenzetti, 2013).

### **I.8.4. Lyophilisation et lait d'ânesse en poudre**

La lyophilisation de lait d'ânesse n'a pas d'impact sur la concentration en protéines

totales, la concentration en caséines totales, le lysozyme (concentration et activité) et la  $\beta$ -lactoglobuline (Vincenzetti *et al.*, 2011). Seules les concentrations en vitamine C et en  $\alpha$ -lactalbumine sont légèrement impactées par la lyophilisation (Vincenzetti *et al.*, 2011). Quelques asineries françaises proposent la consommation de gélules de lait d'ânesse comme complément alimentaire.

#### **I.8.5. Pasteurisation et lait d'ânesse en bouteille.**

Aspri *et al.* (2017) ont montré que le pH du lait d'ânesse traité thermiquement (72°C/ 1min ; 87°C/1min) est plus stable au cours du temps, comparé au lait cru. De même, la pasteurisation du lait d'ânesse à 63 °C pendant 30 min et 72 °C pendant 15 sec n'affectent pas de manière significative le taux d'immunoglobulines (IgA, IgG) par rapport au lait cru non pasteurisé. Ces données concernant la pasteurisation du lait d'ânesse diffèrent de celles obtenues sur le lait maternel humain, où les immunoglobulines A, G et M et le lysozyme se révèlent sensibles à un traitement thermique de 62°C pendant 30 min (Sousa *et al.*, 2014).

# **Chapitre II**

## **Matériels et Méthodes**

## **Chapitre II. Matériels et méthodes**

### **II.1. Matériel biologique : origine des souches**

Les neuf souches lactiques utilisées dans ce travail ont été isolées à partir du lait d'ânesse et proviennent de la collection de souches de notre laboratoire où elles sont conservées à -20°C dans du glycérol.

Une souche de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, codée Bb12, issue également de la collection de notre laboratoire a été utilisée comme souche bénéfique de référence.

### **II .2. Méthodes**

#### **II.2.1 Revivification et pureté des souches**

Les souches ont été réactivées sur milieu M17 et MRS cystéiné liquide et incubées en anaérobiose à 37 C° pendant 24 à 72 h. Des ensemencements sur milieu M17 et MRS gélosé ont été effectués, suivis par des repiquages par stries d'épuisement de colonies obtenues afin de vérifier leur pureté.

Les boîtes de pétrie ensemencées par des monocultures ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. Les colonies ont été soumises à des observations macroscopique et microscopique.

L'observation macroscopique s'effectue directement à l'œil nu, et se base sur les caractères morphologiques (forme et taille des colonies, les chromogènes, l'opacité, l'élévation, l'aspect de la surface et du contour, ainsi que la consistance) des colonies obtenues sur milieu solide M17 et MRS (De Mann, Rogosa, Sharp, 1960).

La pureté de la souche est vérifiée sous microscope photonique en utilisant un frottis frais et des frottis fixés et soumis aux colorations au bleu de méthylène et de Gram.

#### **II.2.2. Recherche de la catalase et oxydase**

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 selon la réaction suivante :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$  (Marchall et al., 1991).

Une recherche d'oxydase est une technique d'identification concernant les bactéries à gram négatif et la recherche d'enzyme oxydase.

## **II.2.3. Identification génétique des souches.**

### **II.2.3.1. Préparation des isolats.**

Cette manipulation concerne 2 souches seulement (S5 et S8) sur les neuf souches isolées. Une colonie de chaque isolat (S5 et S8) pur est repiquée en stries sur milieu gélosé PCA-lait avant d'être incubée à 37°C pendant 24 à 48 h; puis transportée sous froid au Centre de Recherche « CRAPC » de Bou-Ismaïl (wilaya de Tipaza) pour l'identification selon la méthode employant le MALDI-TOF (de l'anglais « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight* »).

### **II.2.3.2. Identification au MALDI-TOF.**

Un instrument de type MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation LASER assistée par une matrice désignée « *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation* ».

La spectrométrie à temps de vol (TOF-MS, selon l'acronyme anglais « *Time of Flight Mass Spectrometry* »), est une méthode de spectrométrie de masse dans laquelle les ions sont accélérés par un champ électrique de valeur connue. Il résulte de cette accélération que les ions de même charge électrique acquièrent la même quantité de mouvement. La vitesse des ions, par contre, dépend du rapport masse sur charge. On mesure le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur situé à une distance connue. Ce temps dépendra du rapport masse sur charge de la particule considérée. Ce sont les particules les plus lourdes qui seront accélérées aux vitesses les plus basses. La détermination du rapport masse sur charge découle de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération.

Cette méthode se base sur la comparaison de l'empreinte du protéome de chaque souche bactérienne à celles se trouvant dans une banque de données grâce à un logiciel spécifique. Cette empreinte est générée après une ionisation des colonies (des protéines) par un bombardement laser discontinu, les protéines vont rester séparées grâce à une matrice CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) et vont être dissociées par leurs poids et détectées grâce à leur temps de vol.

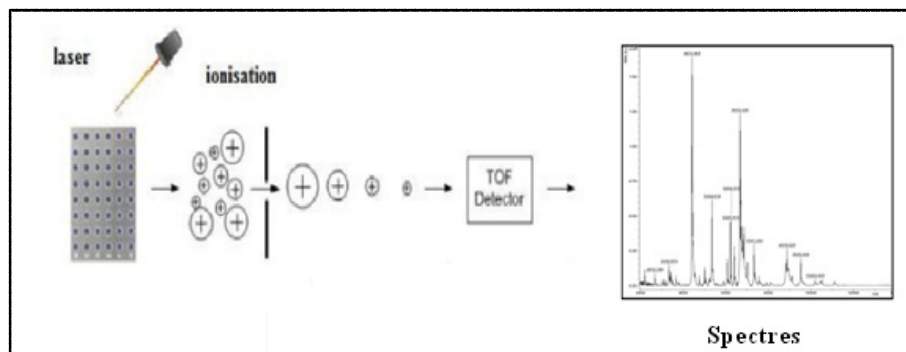
Pour cela, quelques colonies, de chaque isolat, ont été récupérées avec le bout d'un cure-

dent stérile, puis ont été étalées en fine couche sur un spot d'une plaque cible. Chaque film bactérien a été mélangé à 1 µl d'acide formique 70 %.

Puis 1µl d'une solution de matrice CHCA (CHCA Matrix, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) a été ajouté à chaque spot. La plaque (la cible) a été laissée à température ambiante afin que les mélanges se cristallisent.

Le premier spot de la plaque ne contenait que la matrice CHCA seule (le blanc) et dans le second spot, une souche *Escherichia coli* DH5α a été utilisée comme standard pour le calibrage de l'appareil.

Une fois la cible séchée, elle a été introduite dans l'appareil, l'analyse commence après récupération du vide dans la chambre de la cible (fig.5). L'analyse a été faite selon les instructions d'utilisation de Bruker Microflex MALDI-TOF MS instrument (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany), opérant en mode linéaire d'ion positif, dans un intervalle de masse compris entre 2000- 20000 Da (Nacef et al., 2016).



**Figure 5:** Le principe de l'identification par MALDI TOF

### II.2.3.3. Lecture des résultats

Les spectres de masse enregistrés lors de la manipulation ont été analysés par le logiciel MALDI Biotyper 4.0 software database (Bruker Daltonics, GmbH, Bremen, Germany) et comparés avec les profils fournis par sa base de données. Les similarités ont été exprimées par une valeur score (log score) ; il n'y a que les scores au-dessus de 1.7 qui ont été pris en compte comme étant des identifications, les scores en dessous de 1.7 ont été refusés. Le logiciel a classé les scores obtenus comme suit :

- Les scores entre 1.7 et 2 impliquent une probable identification au niveau du genre.
- Entre 2 et 2.3 ces scores représentent une identification probable au niveau de l'espèce avec un genre sécurisé.
- Au-delà de 2.3 les identifications ont une haute probabilité d'identification de l'espèce.
- Le score 3 est considéré comme un score parfait d'identification (Nacef et al., 2016).

#### **II.2.4. Croissance sous différentes concentrations de NaCl, à pH 9.8 et thermorésistance des souches isolées.**

La croissance des souches a été testée à trois concentrations différentes de NaCl (2, 4 et 6.5% : P/V), à un pH de 9.8 et aux températures de 10, 45 et 63.5°C.

Les tests de thermorésistance ont été réalisés dans des tubes contenant du bouillon M17 ou MRS inoculés par les souches isolées pour être ensuite déposés à une température de 10, 45 ou 63.5°C pendant 10 min. Ils sont brusquement refroidis et incubés à 37°C pendant 24 à 48h. Les tests de croissance des souches à différentes concentrations de Na Cl ont été menés dans les mêmes milieux de culture, également incubés 24 à 48h à 37°C.

L'apparition d'un trouble indique une croissance des souches (Badis et al., 2005).

#### **II.2.5. Résistance à l' $\alpha$ - amylase salivaire**

Dans une préparation enzymatique renfermant 75 UE (Unité Enzymatique) d' $\alpha$ -amylase salivaire humaine (Sigma, Aldrich, Germany) dans le tampon acétate de sodium (0.1M, pH 5.6) stérilisée par filtration stérilisante à l'aide de filtres Whatman polysulfoné, 0.22 $\mu$ m (fig 6), on incube 1mL d'une culture bactérienne (concentration finale 1.10<sup>8</sup> UFC/mL). On effectue le dénombrement des cellules viables après 48h d'incubation en anaérobiose à 37°C sur la gélose M17 et MRS cystéiné.

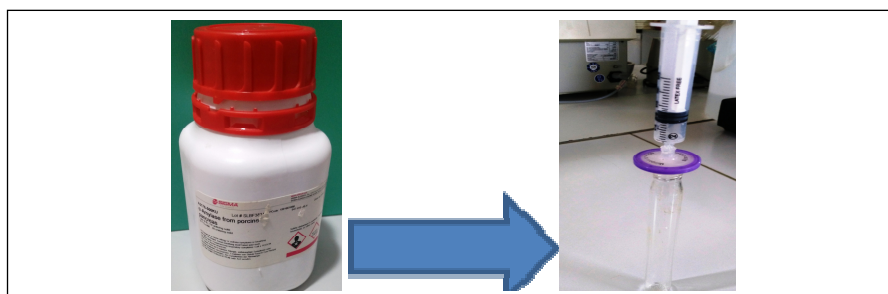
#### **II.2.6. Résistance des souches aux conditions gastro-intestinales simulées**

Dans ce travail, les 9 souches lactiques ont fait l'objet des différents tests qui simulent le parcours que peut subir un microorganisme probiotique durant son passage dans le tractus digestif.

##### **II.2.6.1. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé en transférant 10  $\mu$ l de culture de chaque bactérie dans 10 mL de bouillon MRS et M17 selon la souche considérée et en incubant à 37 ° C pendant 24 h. Les

cellules ont été récoltées dans un tube stérile puis centrifugées pendant 5 min à 8000 tours/min (fig. 7). Le culot obtenu a été remis en suspension dans du tampon BPS stérile



**Figure 6** : préparation d'enzyme d' $\alpha$ -amylase salivaire

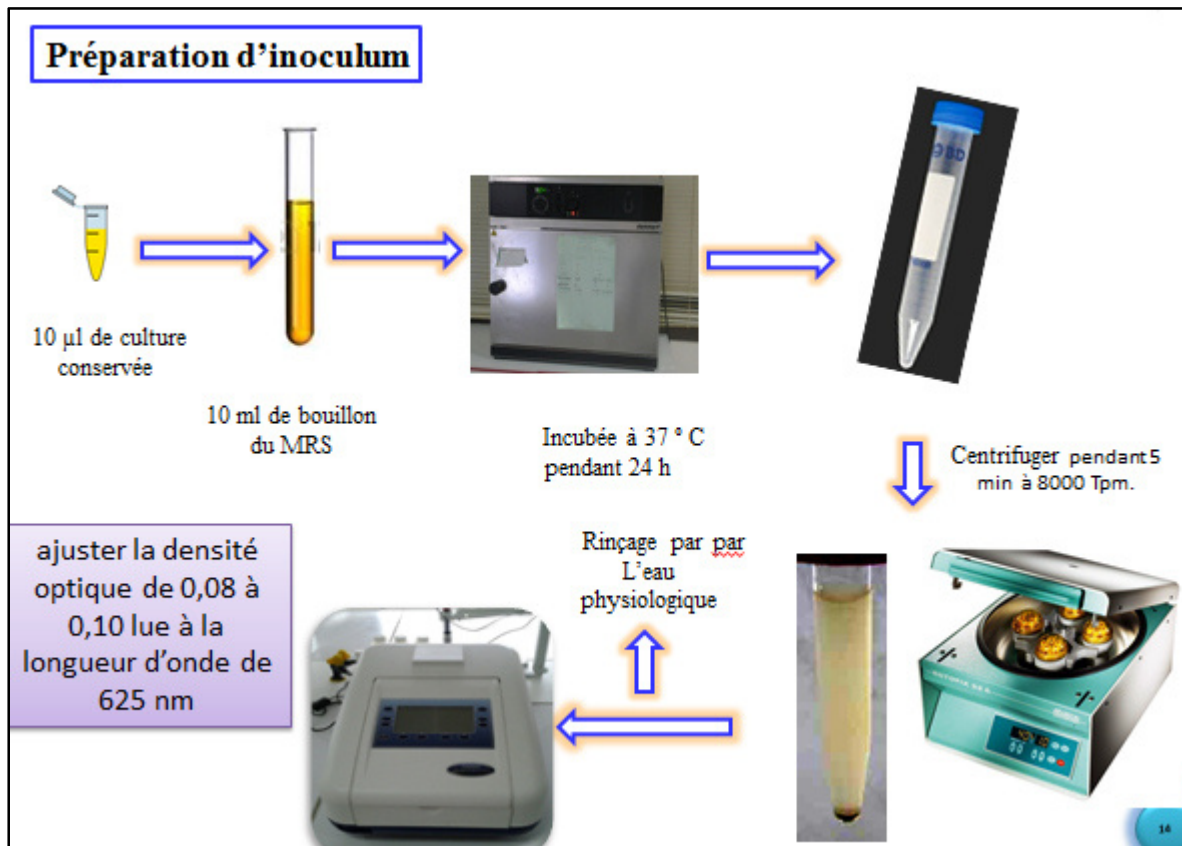
pour ajuster la densité optique à 0.5 à lue à la longueur d'onde de 620 nm qui correspond à de  $3,2 \times 10^9$  UFC/mL (Kishor, 2005).

#### **II.2.6.2. Conduite du test de résistance des souches aux conditions gastriques simulées**

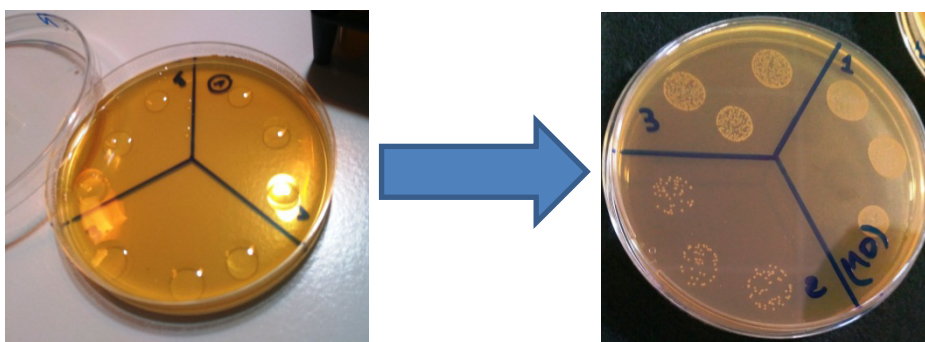
La résistance des neuf souches et la souche témoin Bb12 à l'hostilité du modèle gastrique simulé (MGS) a été appréciée dans une préparation du suc gastrique simulé a été préparé en suspendant de la pepsine (Riedel-de-Haën AG, Germany) dans une solution saline stérile (0,85% NaCl, p / v) à une concentration finale de 3g / L et en ajustant le pH 2 avec du HCl 1M stérile en utilisant un pH-mètre (Giulio et al., 2005).

- Inoculer 100  $\mu$ L de cellules bactériennes libres à  $1.10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup> de concentration finale.
- Incuber à 37°C en anaérobiose pendant 1h30. Les essais sont effectués en triple.

Le nombre de cellules viables a été évaluée par dénombrement sur gélose M17 ou MRS, une série de dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ..... $10^{-7}$ ) dans 450  $\mu$ l de MRS bouillon a été réalisée (fig. 3 et 4).



**Figure 7** : préparation d'inoculum



**Figure 8** : Méthode des spots (Guiraud, 2012).

Pour la réalisation de ce protocole, chaque boîte contenant du MRS ou du M17 solide est divisée en 3 parties; à l'aide d'une micropipette, on dépose 3 spots (10 µl) d'une dilution dans chaque partie. Après avoir déposé les différents diluants dans toutes les boîtes, on incube le tout dans l'étuve à 37°C (Guiraud, 2012). Les colonies présentes sur les boîtes sont dénombrées après 24h à 48h d'incubation.

Il y a uniquement les boîtes contenant 30 à 300 colonies qui ont été retenues. La formule suivante a été utilisée pour calculer le nombre d'UFC/mL:

$N = \Sigma n \text{ colonies} \cdot 1000 \mu\text{l} / 30 \mu\text{l}$ : nombre des colonies comptées ;

N: unité formant Colonies (UFC).

Pour calculer le taux de survie en pourcentage on utilise la formule suivante:

Taux de survie % =  $(\log \text{ UFC à T(n)h} / \log \text{ UFC à T0}) \times 100$

#### **II.2.6.3. Résistance des souches isolées aux conditions intestinales simulées (0.05g/L de sels biliaires et 0.1g/L de lysozyme).**

Le jus intestinal simulé a été préparé par la suspension du lysozyme (Fluka) (fig.10) dans le tampon phosphate stérile et en ajustant le pH à 7.5 avec NaOH 0.1 M pour atteindre une concentration finale de 0,1 g / L avec 0,05 % de sels biliaires (*Sigma*) incubation à 37 °C pendant 12h (Doherty et al. 2011) Les essais sont effectués en triple.

Le nombre de cellules viables a été évalué par dénombrement sur gélose M17 ou MRS (Guiraud, 2012).

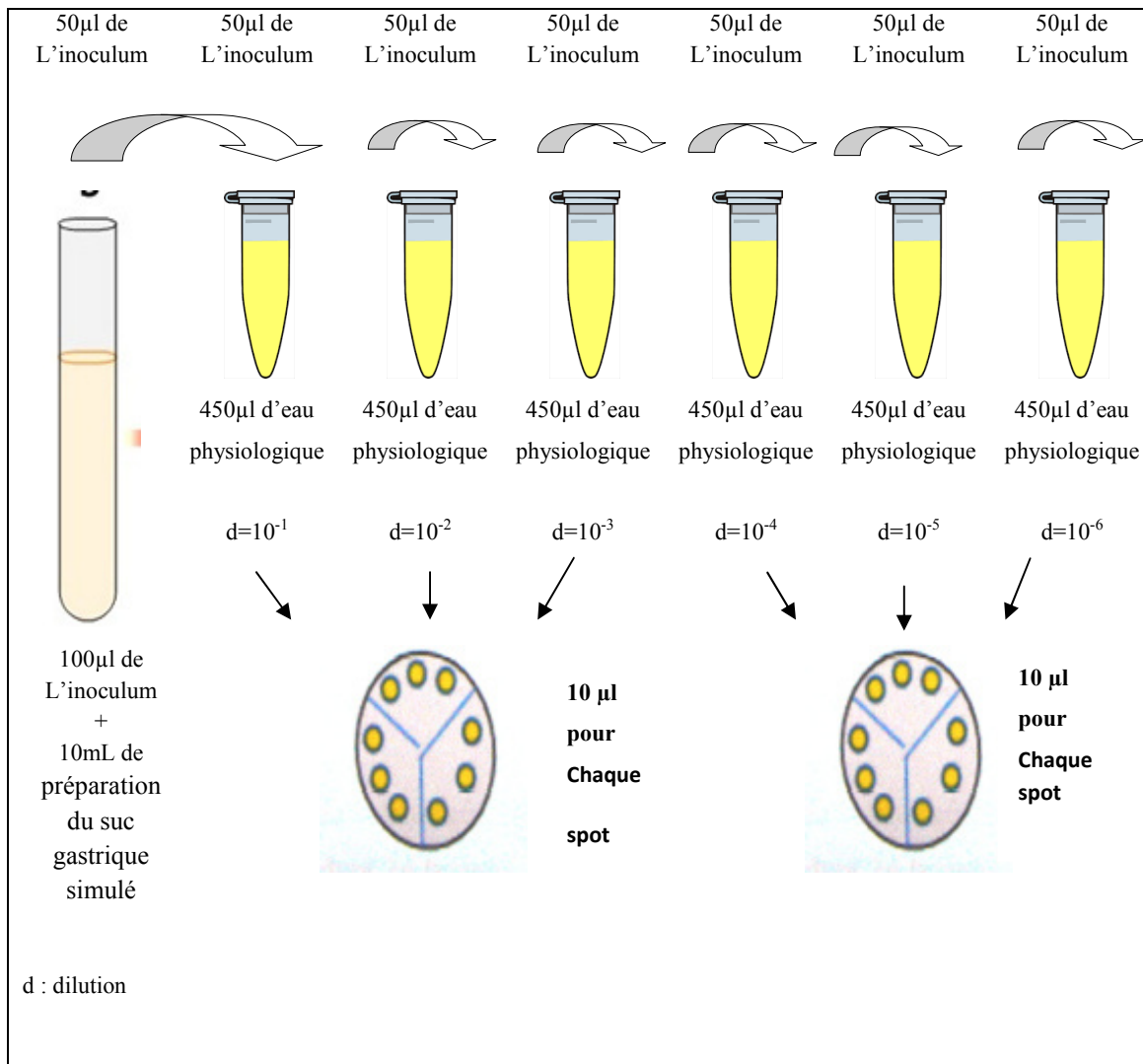
#### **II.2.6.4. Résistance des souches isolées aux conditions pancréatiques simulées**

Le fluide duodéal artificiel a été préparé à base d'un complexe enzymatique (Ziarno, 2007). Ce fluide duodéal contient

- 5,0 g de NaCl (BIOCHIM, France)
- 0,6 g de KCl (BIOCHIM, France)
- 0,03 g de CaCl<sub>2</sub> (BIOCHIM, France)
- 17 g de sels biliaires (Sigma Aldrich Germany) dissous dans 1 L de NaHCO<sub>3</sub> 1M/ L (ACROS).

Après autoclavage (121°C pendant 15 min), Le pH du jus de base était de  $7 \pm 0.2$  et le complexe enzymatique a été ajouté (deux capsules par 50 mL de jus).

Une préparation pharmaceutique appelée Creon® 10 000 (Solvay Pharmaceuticals) a été



**Figure 9** : Technique de dilution et de dénombrement (Guiraud, 2012)



**Figure 10** : préparation de la solution enzymatique (lysozyme)

utilisée comme source du complexe enzymatique (fig.11). Une capsule Creon® 10 000 contient :

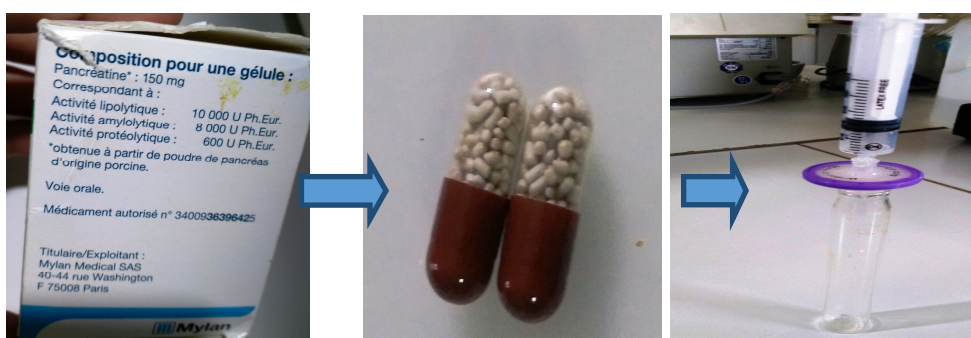
150 mg d'enzymes de la pancréatine:

10 000 F.I.P. unités de lipases,

8 000 F.I.P. unités d'amylases,

600 F.I.P. unités de protéases.

1mL de chaque souche (culture jeune de 18h) d'une densité optique de 0.5 à lue à la longueur d'onde de 620 nm qui correspond à de  $3.2 \times 10^9$  UFC/mL (Kishor, 2005) est centrifugé à 8000 rpm/ 5min ; le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate de sodium et a servi pour inoculer le fluide duodénal préparé et qui a été incubé à 37 °C en anabiose pendant 5h. La proportion des cellules viables a été évaluée par dénombrement sur gélose M17 ou MRS



**Figure 11:** Préparation pharmaceutique Creon® (complexe enzymatique).

### II.3. Analyse statistique

Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATBOX (version Pro 6.40). La comparaison des moyennes a été réalisée par le test de Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. La différence est considérée significative à  $P < 0.05$ .

# **CHAPITRE III**

## **Résultats et Discussion**

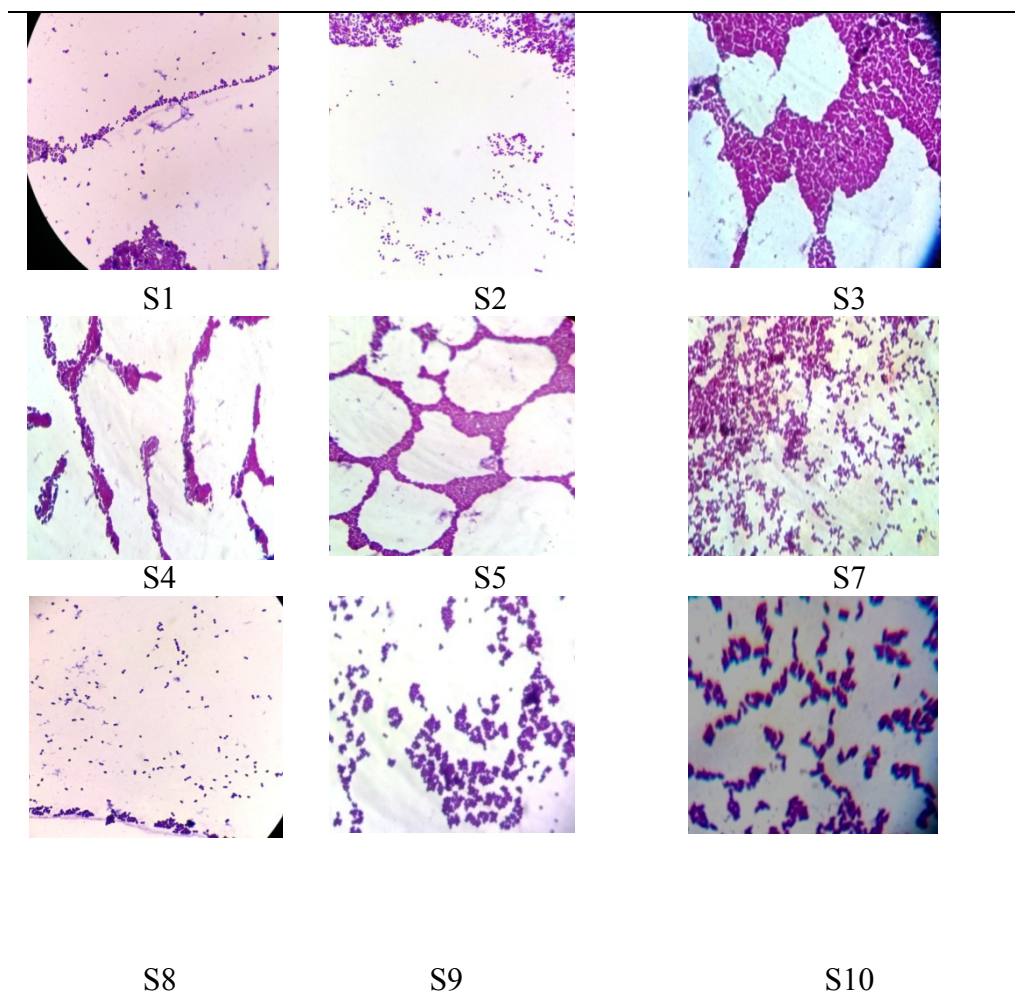
## Chapitre III. Résultats-Discussion

### III.1. Caractéristiques morphologiques et culturelles des souches étudiées.

#### III.1.1. Caractères morphologiques des souches étudiées

L'observation macroscopique des neuf souches après l'obtention d'une culture dense sur milieu M17 et MRS montre des petites colonies blanchâtres, de surface lisse plus ou moins bombées et à contours réguliers.

L'observation microscopique de ces colonies après coloration de Gram sous un objectif à immersion d'un microscope photonique (grossissement x 100) laisse apparaître qu'il s'agit de coques et coccobacilles regroupés en petites chainettes ou isolés colorés en violet ; ce sont des bactéries à Gram positif, ce qui confirme la pureté des souches (fig. 12).



**Figure 12** : Coloration de Gram de différentes souches testées

### III.1.2. Caractères cultureux des souches lactiques étudiées.

Toutes les souches isolées sont capables de croître sur bouillon MRS et M17 à pH 9.8 et aussi capable de croître sur bouillon MRS avec les différentes concentrations de NaCl et les différentes températures. Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Résultats des tests Catalase, oxydase, et de croissance à différentes concentrations de NaCl (2, 4 et 6.5% : P/V), à différentes températures (10, 45 et 63.5°C) et à pH 9.8

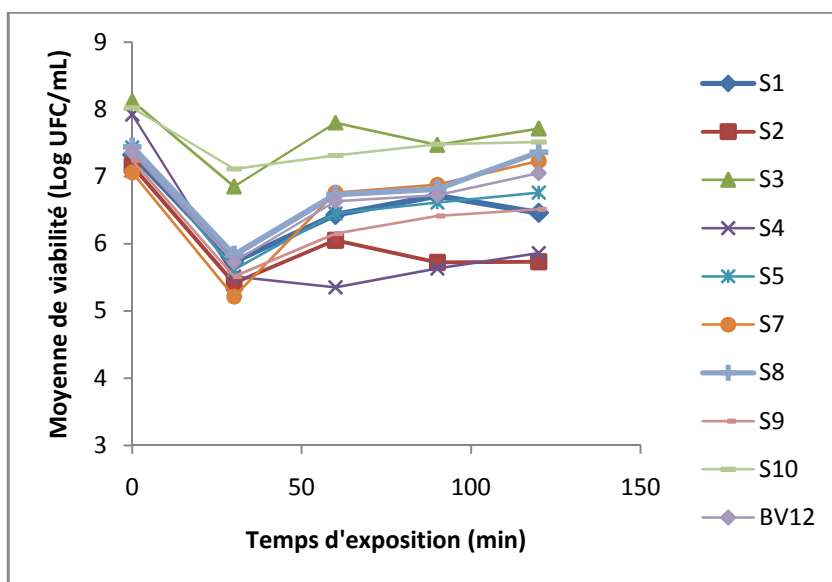
| Souche | Catalase | Oxydase | NaCl (% : P/ V) |   |     | PH= 9.8 | 10°C | 45 °C | 63,5 °C |
|--------|----------|---------|-----------------|---|-----|---------|------|-------|---------|
|        |          |         | 2               | 4 | 6,5 |         |      |       |         |
| S1     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S2     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S3     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S4     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S5     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S6     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S7     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S8     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |
| S9     | -        | -       | +               | + | +   | +       | +    | +     | +       |

### III.2. Résistance des souches lactiques isolées aux hostilités digestives simulées *in vitro*

#### III.2.1 Résistance à l' $\alpha$ -amylase salivaire

L'amylase est une enzyme digestive classée comme saccharidase (enzyme qui dépolymérise les polysaccharides). C'est surtout un constituant du suc pancréatique et de la salive, requis pour le catabolisme des glucides à longue chaîne (comme l'amidon) en unités plus petites (Labbe et al. 1992).

L'effet de l' $\alpha$ -amylase salivaire sur la viabilité des souches testées est illustré par la figure 13. Au départ, toutes les souches testées ont montré une perte de viabilité lorsqu'elles étaient exposées à cette enzyme. Il y avait une moyenne de 5.86 log UFC/mL de bactéries testées viables après 30 min d'exposition. Ces bactéries se sont multipliées par la suite pour atteindre 6.79 log UFC/mL après 2 h d'exposition. Les souches les plus résistantes à l' $\alpha$ -amylase salivaire sont S3, S7, S8 et S10, avec une viabilité 7.71, 7.51, 7.36 et 7.23 log UFC / mL respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Haider et Husain (2008).



**Figure 13** : Effet de l' $\alpha$ -amylase salivaire (75 UE) sur la viabilité des souches testées

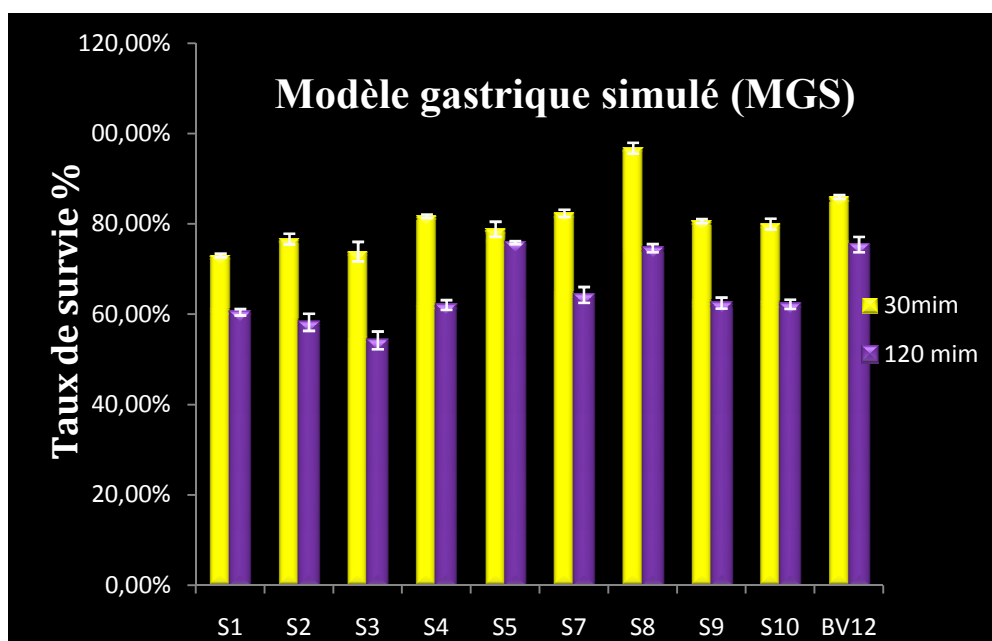
### III.2.2. Résistance des souches lactiques isolées aux conditions gastro-intestinales simulées in vitro

Les souches à potentiel probiotique doivent être non seulement capables de résister aux hostilités digestives lors de leur transit par l'estomac et les intestins, mais aussi avoir la capacité de proliférer dans l'intestin pour exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte.

#### III.2.2.1. Résistance des souches lactiques isolées dans un modèle gastrique simulé in vitro à pH 2.

La résistance des souches lactiques étudiées à l'hostilité gastrique reproduite in vitro par un modèle gastrique simulé (suc gastrique + acidité) est illustrée par le taux de survie de ces souches dans un tel environnement reporté à la figure 14.

Toutes les souches testées ont montré une perte significativement ( $p < 0.05$ ) constante de leur viabilité lorsqu'elles étaient exposées à ces conditions hostiles.



**Figure 14** : Taux de survie (en %) des souches lactiques testées dans un modèle gastrique simulé in vitro à pH=2.

Au départ, il y avait une moyenne de 6.18 log UFC/mL de bactéries testées viables ; mais après 30 min d'exposition, la moyenne de viabilité des cellules a été réduite à 5.09 log UFC / mL (soit une perte de viabilité de 15%).

Les souches les plus tolérantes aux conditions gastriques dans les premières 30 min sont les souches S5 et S8 comparées à la souche probiotique témoin Bb12. La viabilité a encore été réduite à une moyenne de 4.07 log UFC/mL, soit une perte de viabilité de l'ordre de 34.14% après 1h30 min d'exposition. Les souches S5 et S8 se sont révélées les plus tolérantes à l'acidité par rapport à la souche probiotique de référence Bb12.

Certains auteurs comme Shabala et Ross (2008) attribuent cette résistance des souches aux conditions acides de l'estomac à la présence chez ces bactéries de l'acide cyclopropane synthase qui leur permet de mieux résister à l'acidité, car cette enzyme a la capacité de stabiliser la membrane cellulaire en diminuant sa perméabilité aux protons H<sup>+</sup>.

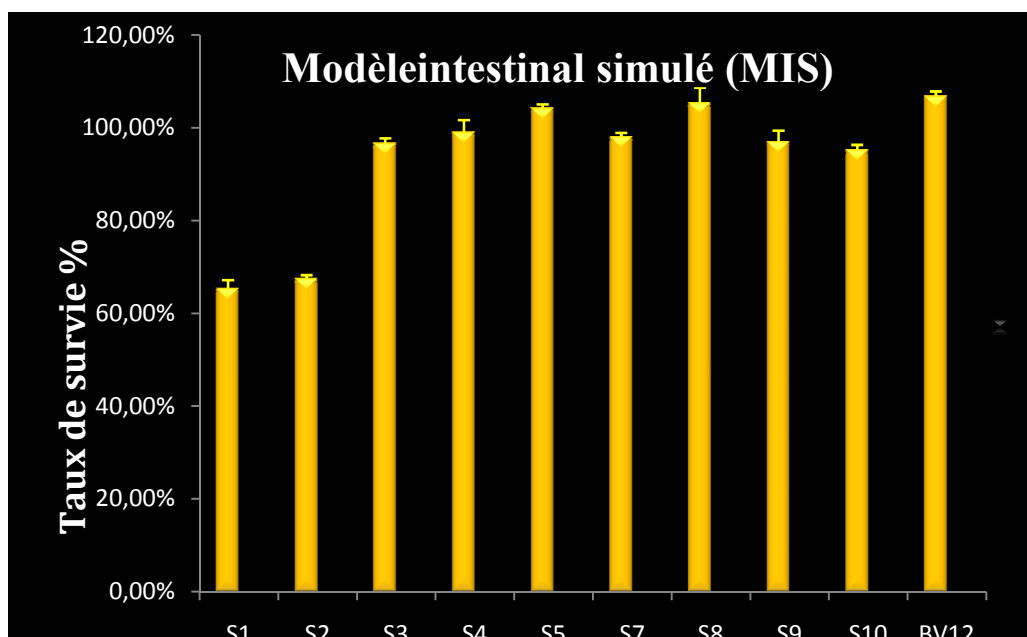
Les souches de S1 et S2 étaient les plus sensibles aux conditions gastriques après 1h 30 d'incubation à pH 2. Les résultats de cette étude concordent avec ceux rapportés par Ding et Shah (2007) pour des bactéries probiotiques libres (non encapsulées).

### **III.2.2.2. Résistance des souches lactiques isolées aux conditions intestinales simulées In vitro (0.05g de sels biliaires/L et 0,1g de lysozyme/L)**

La tolérance à la bile et au lysozyme (jus intestinal simulé) a été étudiée selon le protocole de Doherty et al. (2011). Après 12 h d'incubation, seules les viabilités des souches lactiques libres (non encapsulées) étudiées S1 et S2 ont été significativement ( $p < 0.05$ ) réduites de 34.50 et 35.21% respectivement ; ce qui correspond à des taux de viabilité respectifs de 65.50 et 64.79% (fig. 15).

Les souches S5 et S8 sont les souches les plus tolérantes à la bile et au lysozyme comparées à la souche témoin Bb12 ; cette résistance au lysozyme pourrait être due à l'un des trois mécanismes moléculaires de résistance suivants préconisés par Lehman et al., (1985) :

- l'inhibition de l'action lytique du lysozyme
- l'inhibition de l'action non lytique du lysozyme
- l'inactivation du lysozyme.

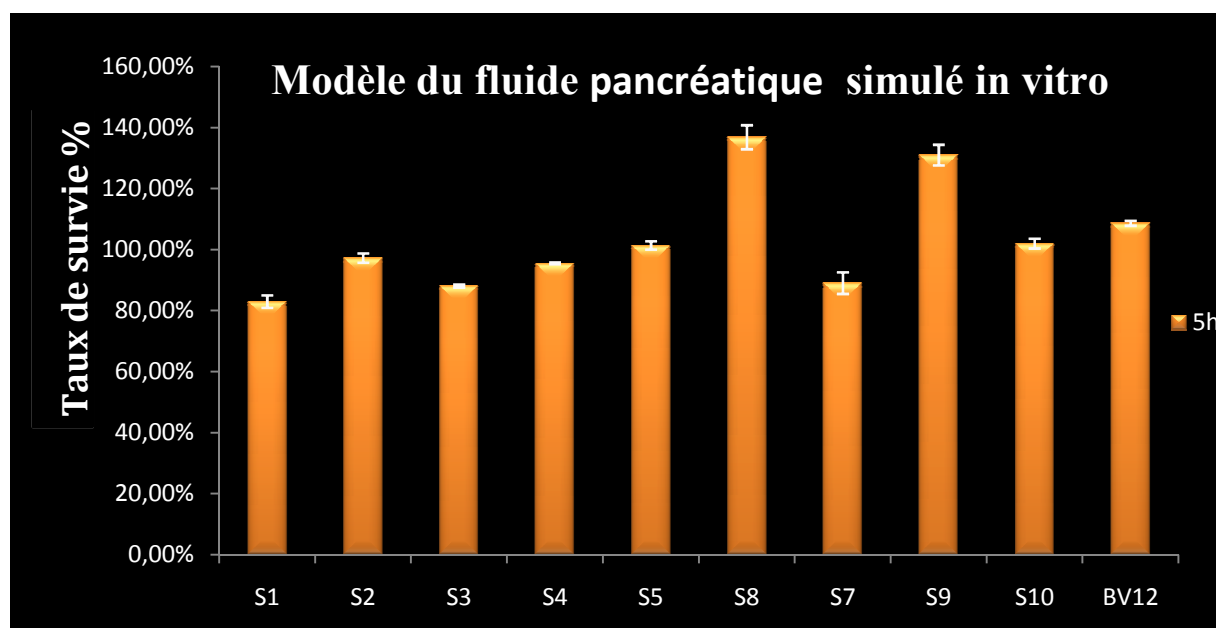


**Figure 15** : Taux de survie des souches isolées aux conditions intestinales simulées in vitro (0,05 g/ L de sels biliaires et 0,1 g / L lysozyme)

### II.2.3. Résistance des souches isolées aux conditions du fluide pancréatique simulées in vitro.

La survie des souches libres (non encapsulées) aux conditions du fluide pancréatique simulées in vitro qui contient les enzymes pancréatiques: lipase,  $\alpha$ -amylase, protéases est présentée dans la figure 16.

Les taux de survie obtenus (plus de 80%) reflètent une bonne résistance aux conditions du fluide pancréatique simulées. Ces taux de survie sont variables selon la souche considérée mais sont au minimum de 82% de survie et la meilleure tolérance était enregistrée pour a souche S8. Ces résultats montrent que les neuf souches ont une capacité résistance significative ( $p < 0.05$ ) aux enzymes pancréatiques comparées à la souche probiotique témoin Bb12. Certaines souches testées ont non seulement survécu à la présence d'enzymes pancréatiques mais aussi ont poursuivi leur croissance en affichant des taux de survie de plus de 100%. Nos résultats sont comparables à ceux de Ziarno (2007).



**Figure 16** : Taux de survie (en %) des souches isolées et exposées aux conditions du fluide pancréatique simulées.

### II.3. Identification au MALDI TOF /MS des deux souches isolées les plus performantes aux tests de croissance et de résistance.

Les deux souches les plus performantes (S5 et S8) aux tests de croissance et de résistance parmi les neuf isolées ont été identifiées au MALDI TOF / MS. Les résultats obtenus sont reportés au tableau 8 et ont confirmé leur appartenance au genre *Enterococcus*.

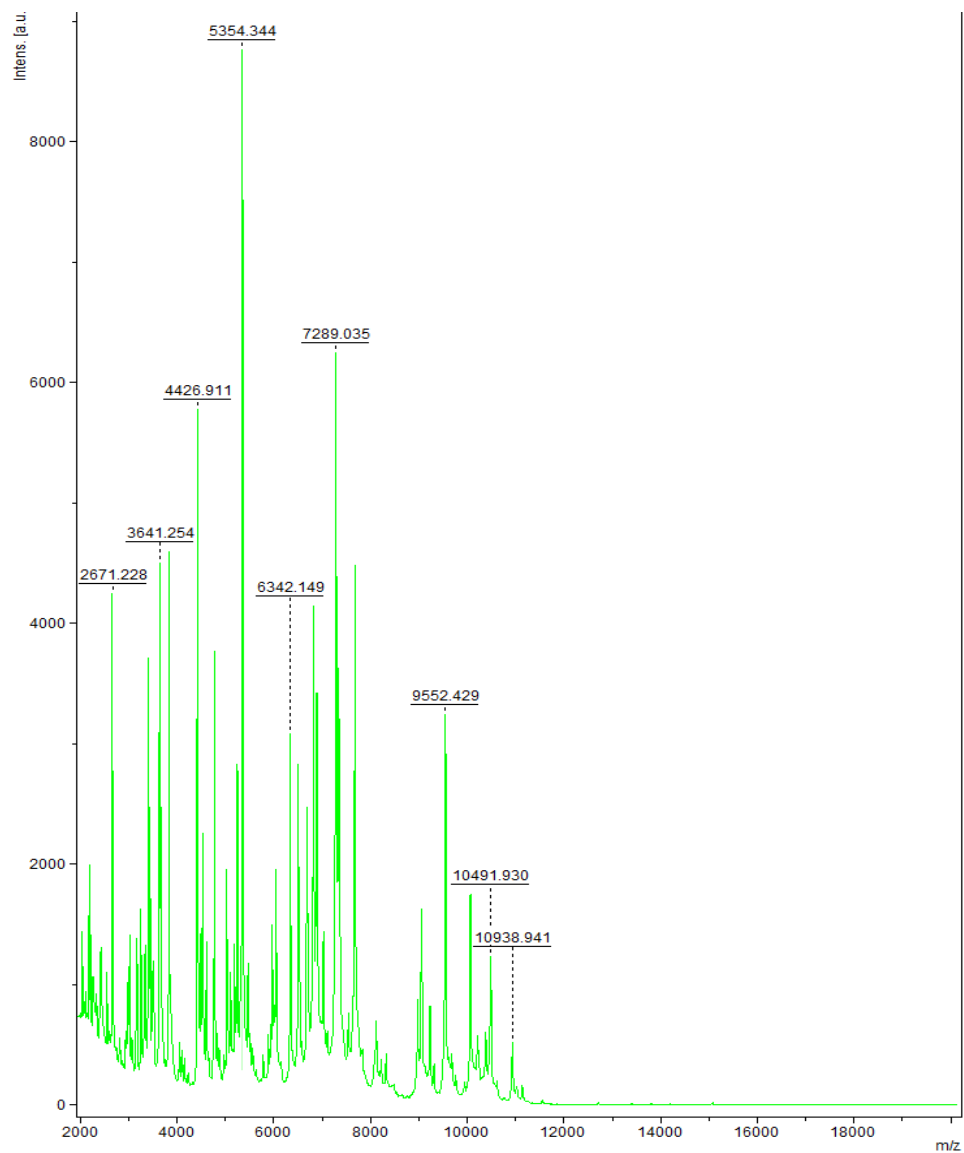
Par ailleurs, l'analyse des spectres de masse au MALDI TOF (fig. 17 et 18) nous a montré que les deux souches (S5 et S8) appartiennent toutes les deux à une même espèce qui est l'espèce *faecium* avec des Scores de 2.40 pour S5 et 2.36 pour S8. Selon Nacef et al. (2016), ces scores sont à haute probabilité d'identification de l'espèce *faecium*.

**Tableau 8:** Identification des souches S5 et S8 par MALDI-TOF/MS avec le score.

| N° | Codes | Identification au MALDI TOF | Nouveaux codes | Score |
|----|-------|-----------------------------|----------------|-------|
| 1  | S5    | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Ef DA5</i>  | 2.406 |
| 2  | S8    | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Ef DA8</i>  | 2.362 |



**Figure 17 :** Profil de spectre de la souche lactique isolée S5



**Figure 18** : Profil de spectre de la souche isolée S8

## Conclusion

Dans cette étude, notre objectif était la recherche systématique de nouvelles souches lactiques à partir du lait d'ânesse pouvant remplir les nombreux et rigoureux critères que doit remplir une souche donnée pour l'acquisition du statut probiotique.

Dans cette optique, nous avons pu isoler neuf souches lactiques à partir du lait d'ânesse. Ces souches ont été identifiées d'abord sur la base d'observations macroscopique et microscopique, ensuite sur la base de tests biochimiques comme étant des coques et cocobacilles gram positives.

Ces neuf souches ont subi des tests de croissance sous différentes concentrations en NaCl et différentes températures avant d'être engagées dans des tests de résistance aux conditions hostiles du tractus digestif. Les résultats observés indiquent que les souches les plus performantes dans ces tests sont les souches S5 et S8.

Nous avons volontairement retenu ces deux souches S5 et S8 pour une identification moléculaire par la méthode MALDI TOF/MS qui a montré qu'elles appartiennent au même genre et à la même espèce qui est *Enterococcus faecium* avec des scores respectifs de 2.40 pour S5 et 2.36 pour S8.

Etant donné les performances constatées pour ces deux souches en ce qui concerne leur viabilité lors du transit dans le tube digestif, elles seront retenues pour d'autres tests d'éligibilité au statut probiotique tels que la compétition trophique ou antagonisme vis-à-vis de germes responsables de toxi-infections, la survie in vivo et l'expression des principales propriétés probiotiques chez l'hôte. Ce sont là, les perspectives à court terme de la continuité de cette thématique.

### Références bibliographiques

1. Alabiso, M., Giosuè, C., Alicata, M.L., Mazza, F., and Iannolino, G. (2009). The effects of different milking intervals and milking times per day in jennet milk production. *Animal* 3, 543–547
2. Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., and Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*.
3. Aspri, M., Economou, N., and Papademas, P. (2017). Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Rev. Int.* 33, 316–333.
4. Badis A., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &*
5. Baillet (1888). *Le marchand de lait d'ânesse- Toulouse*. (d'après [www.archives.cg31.fr](http://www.archives.cg31.fr)).
6. Benachour, A., Ladjouzi, R., Jeune, A.L., Hébert, L., Thorpe, S., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.-P., Prajsnar, T.K., Foster, S.J., and Mesnage, S. (2012). The Lysozyme-Induced Peptidoglycan NAcetylglucosamine Deacetylase PgdA (EF1843) Is Required for Enterococcus faecalis Virulence. *J. Bacteriol.* 194, 6066–6073.
7. Brumini, D., Furlund, C.B., Comi, I., Devold, T.G., Marletta, D., Vegarud, G.E., and Jonassen, C.M. (2013). Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5. *Int. Dairy J.* 28, 109–111.
8. Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G.E., and Marletta, D. (2015). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Sci. Technol.*
9. Buffon (1788). *Histoire naturelle, générale et particulière, par Leclerc de Buffon*. *Tech*, 23 : 30-37.
10. Chianese, L., Calabrese, M.G., Ferranti, P., Mauriello, R., Garro, G., De Simone, C., Quarto, M., Addeo, F., Cosenza, G., and Ramunno, L. (2010). Proteomic characterization of donkey milk "caseome." *J. -Chromatogr. A* 1217, 4834–4840.
11. Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., and Grazia, L. (2005). Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Le Lait* 85, 481–490.
12. Chiofalo, B., Dugo, P., Bonaccorsi, I.L., and Mondello, L. (2011). Comparison of major lipid components in human and donkey milk: new perspectives for a hypoallergenic diet in humans. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33, 633–644.
13. Chiofalo B. (2001). Ass's milk : exploitation of an alimentary resource.
14. Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., et al. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31, 251–262.
15. Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., and Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42, 188–201.
16. Cunsolo, V., Muccilli, V., Fasoli, E., Saletti, R., Righetti, P.G., and Foti, S. (2011). Poppea's bath liquor: The secret proteome of she-donkey's milk. *J. Proteomics* 74, 2083–2099.

17. Cosentino, C. Paolino, R.; Freschi, P. ; Californielluso, A. Short communication: Jenny milk as an inhibitor of lipase in cheese: a preliminary report. *J. Laiterie Sci.* 2013 , 96 (6), 3547 - 3550.
18. Cavallarin, L., Giribaldi, M., Soto-Del Rio, M. de los D., Valle, E., Barbarino, G., Gennero, M.S., and Civera, T. (2015). A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in NorthWestern Italy. *Food Control* 50, 230–235.
19. Civardi, G. ; Curadi, M. ; Orlandi, M. ; Cattaneo, T. ; Giangiacomo, R. électrophorèse capillaire (CE) appliquée à l' analyse de la matière " lait. *Milchwissenschaft.* 2002 , 57 (9) 515 - 517.
20. Doherty S, Gee V, Ross R, Stanton C, Fitzgerald G, Brodtkorb A. 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids* 25:1604-1617.oherty et al. 2011).
21. El-Agamy, E. Le défi de l'allergie aux protéines du lait de vache. *Petit rumin. Res.* 2007 , 68 (1), 64 - 72.
22. Fantuz, F. ; Ferraro, S. ; Todini, L. ; Mariani, P. ; Piloni, R. ; Salimei, E. Oligo-éléments essentiels dans le lait et le sérum sanguin des ânes en lactation comme affecté par stade de lactation et complément alimentaire. *Revue de Médecine Animale* 2013 , 7 (11) 1893 - 1 899.
23. Gastaldi, D. ; Bertino, E. ; Monti, G. ; Baro, C. ; Fabris, C. ; Lezo, A. ; Medana, C. ; Baiocchi, C. ; Mussap, M. ; Galvano, F. âne " lait de composition lipidique détaillée. *Biosci av. (Ed Elite).* 2010 , 2 , 537 - 546.
24. Giulio BD, Orlando P, Barba G, Coppola R, Rosa MD, Sada A, Prisco PPD, Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(5):739-746.
25. Gubić, JM; Šarić, L.Ć ; Šarić, BM; Mandić, AI; Jovanov, PT; Plavšić, DV; Okanović, Đ. G. Microbiologique, propriétés chimiques et sensorielles d'âne domestique " lait de S auto-chthones de race serbe. *J. Food Nutr. Res.* 2014 , 2 (9), 633 - 637.
26. Gubic, J., Tomic, J., Torbica, A., Ilicic, M., Tasic, T., Saric, L., and Popovic, S. (2016). Characterization of several milk proteins in Domestic Balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 22, 9–15.
27. Guo, H. ; Serrement, K. ; Zhang, X. ; Zhao, L. ; Chen, S. ; réong, M. ; Ren, F. Composition, physiochimie et propriétés, azote fraction distribution et acides aminés du lait de âne. *J. Dairy Sci.* 2007 , 90 (4), 1635 -1643.
28. Guiraud J., Haley P (2012): *l'analyse microbiologique dans les IAA* , Paris les éd de l'usine, 180, 240p. Génie alimentaire.
29. H. Ziar, P. Gérard and A. Riazi (2012). Calcium alginate-starch improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1421–1429.

30. Heaney, R.P. (2000). Calcium, Dairy Products and Osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 83S–99S.
31. Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.-P., Auffray, Y., and Benachour, A. (2007). Enterococcus faecalis Constitutes an Unusual Bacterial Model in Lysozyme Resistance. *Infect. Immun.* 75, 5390–5398
32. Labbé D., Nicolas A., Vassault A., alpha amylase cahier de formation biochimie, bioforma, paris, 1992 :107-114
33. INAM (2014). Observatoire économique et social de la filière asine en France, 2014.
34. allergie alimentaire multiple. *J. Pediatr. Gastroenterol. Écrou.* 1992, 14 (2), 177 - 181.
35. Jirillo, F.; Martemucci, G.; D' Alessandro, A.; Panaro, M.; Cianciulli, A.; Superbo, M.; Jirillo, E.; Magrone, T. Capacité du lait de chèvre à moduler une lymphomonose du sang périphérique humain en bonne santé fonction cellulaire Cyte et polynucléaires: in vitro effets et implications cliniques. *Curr. Pharm. Des.*(2010), 16 (7), 870 - 876.
36. Kishor, G. K., Pande, S. et Podile, A.R. (2005). Biological control of late leaf spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *The American Phytopathological Society*, vol 95, 1157- 1165.
37. Korhonen, H.; Pihlanto, A. Peptides bioactifs: production et fonctionnalité. *Int. Dairy J.* 2006, 16 (9), 945 - 960.
38. Lauziers, V. (2011). L'ALIMENTATION DE L'ÂNESSE EN LACTATION.
39. Lehman, T. J., J. B. Allen, P. H. Plotz, and R. L. Wilder. 1985. Bacterial cell wall composition, lysozyme resistance, and the induction of chronic arthritis in rats. *Rheumatol. Int.* 5:163-167.
40. Miranda, G.; Mahé, MF; Leroux, C.; Martin, P. Outils protéomiques pour caractériser la protéine fraction de lait d'équidés. *Proteomics* 2004, 4 (8), 2496 - 2509.
41. (Mao X Gu J, Sun Y, Xu S, Zhang X, Yang H, Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk milk on A549 human lung cancer cell, *Int Dairy J.* 2009).
42. Marchal N., Bourdon J.L. et Richard, C.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3<sup>ème</sup> édition, Doin éditeurs, Paris
43. Mao, X.; Gu, J.; Sun, Y.; Xu, S.; Zhang, X.; Yang, H.; Ren, F. Anti-prolifératif et anti-tumeur effect des composants actifs dans le lait d'ânesse sur les cellules cancéreuses du poumon humain A549. *Int. Dairy J.* 2009, 19 (11), 703 – 708
44. Monti, G.; Bertino, E.; Muratminerai, MC; Coscia, A.; Cresi, F.; Silvestro, L.; Fabris, C.; Fortunato, D.; Giude Rida, M.G.; Conti, A. Efficacité du dolait de nkey en ten hauteurment problématique vache ' lait allergique children: une analyse in vivod étude in vitro. *Pediatr. Allergie Immunol.* (2007), 18 (3), 258 - 264.
45. Murua, A., Todorov, S.D., Vieira, A.D.S., Martinez, R.C.R., Cencič, A., and Franco, B.D.G.M. (2013). Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1793–1809
46. Nazzaro, F.; Orlando, P.; Fratianni, F.; Coppola, R. Isolement de composants avec antimicrobien propriété du lait d'ânesse: une étude préliminaire. *Ouvrez Food Sci. J.* (2010), 4, 43- 47

47. Nacef M., Chevalier M., Chollet S., Drider D. and Flahaut C., 2016. MALDITOF Mass Spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology* 247: 2-8.
48. Peng, S .; Yang, Y .; Li, S .; Wu, Q .; Shah, NP; Wei, H .; Xu, F. Activités immunomodulatrices de *Lactobacillus rhamnosus* ZDY114 et lait d'ânesse chez des souris BALB / c. *Int. Dairy J.* 2014 , 34 (2),263 – 266
49. Polidori, P., Beghelli, D., Mariani, P., and Vincenzetti, S. (2010). Donkey milk production: state of the art. *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 677–683.
50. Polidori, P., and Vincenzetti, S. (2013b). Effects of thermal treatments on donkey milk nutritional characteristics. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 5, 182–187.
51. Potortì, AG; Di Bella, G .; Turco, VL; Rando, R .; Dugo, G. Non toxique et potentiellement toxique éléments dans le lait d'ânesse italien par ICP-MS et analyse multivariée. *J. Food Comp. Anal.*(2013 ), 31 (1), 161 - 172
52. Règlement E. U. de la Commission , 2004. EC 853/2004. *Official Journal of European Union*, pp 22 - 82.
53. Singleton P. (1999). *Bactériologie*. 4eme Edition. Dunod, Paris. 317 p
54. Sa, A .; Krishnaa, RS; Pavithrab, V .; Hemalathab, V .; Ingalea, P. Production et antibactérien Activité de la bactériocine de *Lactobacillus paracasei* isolée à partir de lait d'ânesse. *Int. J. Curr. Sci.* 2011 , 1 , 109 - 115.
55. Salimei, E .; Fantuz, F. Cheval et lait d'ânesse. Dans le lait et les produits laitiers en nutrition humaine: production, composition et santé ; Park YW, Haenlein GFW, Eds .; John Wiley & Sons Presse: Oxford, 2013; pp 594 - 613.
56. Salimei, E .; Fantuz, F. Cheval et lait d'ânesse. Dans le lait et les produits laitiers en nutrition humaine: production, composition et santé ; Park YW, Haenlein GFW, Eds .; John Wiley & Sons Presse: Oxford, 2013; pp 594 - 613.
57. Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., and Varisco, G. (2004a). Composition and characteristics of ass's milk. *Anim. Res.* 53, 67–78.
58. Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., and Varisco, G. (2004b). Composition and characteristics of ass's milk. *Anim. Res.* 53, 67–78.
59. Shabala L, Ross T. 2008. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H<sup>+</sup> and enhanced ability to extrude H<sup>+</sup>. *Research in Microbiology* 159(6):458-461
60. Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R.B., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., Aceto, S., Gaita, M., Cerino, P., Negri, R., et al. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J. Nutr. Biochem.*
61. Tidona, F .; Criscione, A .; Devold, TG; Bordonaro, S .; Marletta, D .; Vegarud, protéine GE la composition et la taille des micelles de lait d'ânesse avec di ff motifs protéiques érentes: E ff ets sur digestibilité. *Int. Dairy J.* 2014 , 35 (1), 57 - 62.
62. Tesse, R .; Paglialunga, C .; Braccio, S .; Armenio, L. L' adéquation et la tolérance aux fesses ' lait dans un cohorte italienne des enfants avec la vache ' allergie au lait. *Ital. J. Pediatr.* 2009 , 35 ( 19 ). doi: 10.1186 / 1824-7288-35-19.0

63. Tafaro, A .; Magrone, T .; Jirillo, F .; Martemucci, G .; D ' Alessandro, A .; Amati, L .; Jirillo, E. Propriétés immunologiques de l' âne ' lait: son utilisation potentielle dans la prévention des atherosclero-sis. *Curr. Pharm. Des.* 2007 , 13 (36), 3711 - 3717.
64. Uniacke-Lowe, T .; Huppertz, T .; Protéines de lait équin Fox PF: chimie, structure et nutritionnelle signi fi Cance. *Int Dairy J.* 2010 , 20 (9), 609 - 629.
65. Uniacke-Lowe, T .; Fox, lait P. *Equid.* Dans l' Encyclopédie des sciences laitières ; Fuquay, JW, Fox, P.
66. F., McSweeney PLH, 2nd Eds .; Presse académique: San Diego, 2011; pp 518 - 529
67. Verraes, C .; Claeys, W .; Cardoen, S .; Daube, G .; De Zutter, L .; Imberechts, H .; Dierick, K .; Herman, L. Un examen des risques microbiologiques du lait cru d'espèces animales autres que les vaches. *Int. Dairy J.* 2014 , 39 (1), 121 - 130.
68. Vincenzetti, S .; Polidori, P .; Mariani, P .; Cammertoni, N .; Fantuz, F .; Vita, A. âne lait : caractérisation des fractions protéiques. *Food Chem.* 2008 , 106 (2), 640 - 649.
69. Vincenzetti, S .; Savini, M .; Cecchini, C .; Micozzi, D .; Carpi, F .; Vita, A .; Polidori, P. Eff ets de lyophilisation et utilisation des Probiotiques à dos d' âne " caractéristiques nutritionnelles du lait s. *Int. J. Food Eng.* (2011) , 7 (5). doi: 10.2202 / 1556-3758.2032
70. Westermarck, E. *Rituel et croyance au Maroc: Vol. II.* Eds .; Routledge Press: New York. 2013.
71. Yang, Ma L, Zhao XG, and Su DQ (2006). Studies on the development and exploitation of donkey milk. *Chin. Food Nutrition* (22–24).

## Abstract

The aim of this work was to characterize lactic strains isolated from donkey milk by identifying them and testing their growth potential (at different salt concentrations and different temperatures) and their ability to withstand *in vitro* simulated digestive hostilities as a criterion for eligibility for "probiotic" status. The results obtained showed that the nine lactic strains isolated from the donkey milk used in this work keep growing at 10, 45 or 63.5 °C and in the presence of 2.4 and 6.5% (w / v) NaCl. They also display a differential resistance capacity depending on the strain type under the conditions of the digestive tract simulated by salivary  $\alpha$ -amylase, acidity and gastric secretion, bile salts, lysozyme and pancreatic enzymes (pancreatin, lipase, amylase and proteases). Thus, the strains are initially sensitive to salivary  $\alpha$ -amylase but recover growth again after the first 30 minutes of exposure. All strains are slowed in their growth by simulated gastric acidity at levels between 25 and more than 40%. There were 2 strains (S1 and S2) out of 9 tested whose bile salt and lysozyme survival was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced by 35%. Exposure of lactic acid strains for 5 hours to pancreatic enzymes did not significantly alter their survival, the lowest (around 80%) was recorded for strains S1, S3 and S7 whereas other strains kept growing giving rise to more than 100% of survival. It is the S8 strain that has the most resistance to proteases. S5 and S8 strains were the most resistant strains to the digestive tract conditions, and therefore were selected for molecular identification by MALDI TOF, which revealed that they belong to the genus *Enterococcus*. Analysis of the MALDI TOF mass spectra (Fig. 17 and 18) have shown that the two strains (S5 and S8) belong to the same species which is the species *faecium* with scores of 2.40 for S5 and 2.36 for S8.

**Key words :** Donkey milk, lactic acid bacteria, survival, digestive hostilities, Probiotics.

## Résumé

L'objectif de ce travail a été de caractériser des souches lactiques isolées à partir du lait d'ânesse en les identifiant et en testant leur pouvoir de croissance (à différentes concentrations de sel et différentes températures) et leur capacité de résistance aux hostilités digestives simulées *in vitro* en guise de critère d'éligibilité au statut « probiotique ». Les résultats obtenus ont montré que les neuf souches lactiques isolées à partir du lait d'ânesse utilisées dans ce travail continuent de croître à 10, 45 ou 63.5°C et en présence de 2, 4 et 6.5% (P/V) de NaCl. Elles affichent également une capacité de résistance différentielle selon la souche considérée aux conditions du tube digestif simulées par l' $\alpha$ -amylase salivaire, l'acidité et le suc gastrique, les sels biliaires, le lysozyme et les enzymes pancréatiques (pancréatine, lipase, amylase et protéases). Ainsi, les souches sont, au début, sensibles à l' $\alpha$ -amylase salivaire mais reprennent de la croissance après les premières 30min d'exposition. Toutes les souches sont freinées dans leur croissance par l'acidité gastrique simulée à des niveaux compris entre 25 et plus de 40%. Il y a eut 2 souches (S1 et S2) sur les 9 testées dont la survie aux sels biliaires et au lysozyme a été significativement ( $p < 0.05$ ) réduite de 35%. L'exposition des souches lactiques pendant 5h aux enzymes pancréatiques n'a pas beaucoup altéré leur survie dont la plus faible (aux environs de 80%) a été enregistrée pour les souches S1, S3 et S7 ; alors que d'autres souches ont maintenu leur croissance et affiché des taux de survie supérieurs à 100%. C'est la souche S8 qui a le plus résisté aux protéases. Sur l'ensemble des tests de survie aux hostilités digestives réalisés, les souches S5 et S8 se sont révélées les plus résistantes aux conditions du tube digestif et c'est pourquoi elles ont été choisies pour subir une identification moléculaire par MALDI TOF qui a révélé qu'elles appartiennent au genre *Enterococcus*. L'analyse des spectres de masse au MALDI TOF (fig. 17 et 18) nous a montré que les deux souches (S5 et S8) appartiennent toutes les deux à une même espèce qui est l'espèce *faecium* avec des Scores de 2.40 pour S5 et 2.36 pour S8.

**Mots clés :** lait d'ânesse, bactéries lactiques, résistance, hostilités digestives, probiotique.