

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE**

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



**جامعة عبد الحميد ابن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعية و الحياة**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

Présenté par :

**Reziga Souhila et Harchaoui Amira**

Pour l'obtention du diplôme de :

**Master**

**SPECIALITE : BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES**

**THEME :**

**Contribution à l'étude des propriétés technologiques  
chez les bactéries lactiques isolées du lait maternel.**

Soutenu devant le jury composé de :

<b>Président:</b>	<b>GRAR G.</b>	<b>M.A. A U. Mostaganem</b>
<b>Examineur :</b>	<b>TALHI M.</b>	<b>M.A.A U. USTOMB, Oran</b>
<b>Encadreur :</b>	<b>DIB W.</b>	<b>M.C.B U. Mostaganem</b>

*Année universitaire : 2016-2017*

## **Remerciement**

*Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à remercier chaleureusement notre promotrice Mme. Dib Wafaa Pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour son aide qu'elle nous a prodiguée.*

*Nos remerciements s'adressent également aux responsables des laboratoires de microbiologie de l'université de Mostaganem et l'université d'Oran.*

*On remercie particulièrement les membres du jury d'avoir accepté de juger notre modeste travail.*

*Et finalement, tous les gens qui nous ont soutenus de près comme de loin pour mener à terme ce travail.*

## Résumé

La recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques continue de faire l'objet des travaux de recherches récentes. Les aptitudes technologiques des souches lactiques sont généralement instables, ce qui pousse la communauté scientifique à rechercher de manière continue des souches performantes isolées des différents écosystèmes.

Dans ce présent travail nous avons choisis d'étudier les bactéries lactiques isolées à partir des échantillons du lait de 10 femmes qui ont été collectés auprès des différentes polycliniques de la région oranaise, pour réaliser notre travail nous avons adopté le plan suivant :

- Détermination de l'acidité titrable des souches en fonction du temps
- La mesure de variation du pH après chaque heure d'incubation pendant 4h
- Réalisation de dénombrement par ensemencement en profondeur sur gélose MRS puis incubé pendant 24h
- Tester l'activité protéolytique de ces souches par l'utilisation de l'électrophorèse.

Les résultats sont comme suit:

- cinq souches ont été sélectionnées pour leur pouvoir acidifiant, leurs cinétique de croissance et leur activité protéolytique (*Enterococcus sp1*, *Lactobacillus sp1*, *Lactobacillus sp4*, *Enterococcus sp6*, *Enterococcus sp4*). Ces derniers, hydrolysent toutes les protéines du lait y compris la protéine <sup>2</sup>-lactoglobuline qui est une protéine allergisante.

En conclusion, les genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* peuvent être utilisés dans des laits infantiles hypoallergéniques..

---

**Mots clés:** lait maternel- pouvoir acidifiant – activité protéolytique - *Enterococcus* *Lactobacillus* - protéines du lait de vache.

<b>Figure 1 :</b>	Aspect macroscopique des colonies par ensemencement en surface.	20
<b>Figure 2 :</b>	Aspect microscopique des cellules (Grossissement 10* 100) après coloration de Gram	21
<b>Figure 3 :</b>	Cinétique de variations du pH au cours de la fermentation de lait de vache à 45°C par <i>Enterococcus sp1</i> (Ent1), <i>Lactobacillus sp1</i> (Lb1), <i>Enterococcus sp5</i> (Ent5), <i>Lactobacillus sp4</i> (Lb4) et <i>Enterococcus sp 6</i> (Ent6) et lait stérile sans ferment (C).	23
<b>Figure 4 :</b>	Cinétique de variations du pH au cours de la fermentation de lait de vache à 45°C par <i>Enterococcus sp2</i> (Ent2), <i>Enterococcus sp3</i> (Ent3), <i>Enterococcus sp4</i> (Ent4), <i>Lactobacillus sp2</i> (Lb2) et <i>Lactobacillus sp3</i> (Lp3) et lait stérile sans ferment (C).	24
<b>Figure 5 :</b>	Cinétique de production de l'acide lactique au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par <i>Enterococcus sp1</i> (Ent1), <i>Lactobacillus sp1</i> (Lb1), <i>Enterococcus sp5</i> (Ent5), <i>Lactobacillus sp4</i> (Lb4) et <i>Enterococcus sp 6</i> (Ent6) et lait stérile sans ferment (C).	25
<b>Figure 6 :</b>	Cinétique de production de l'acide lactique au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par <i>Enterococcus sp2</i> (Ent2), <i>Enterococcus sp3</i> (Ent3), <i>Enterococcus sp4</i> (Ent4), <i>Lactobacillus sp2</i> (Lb2) et <i>Lactobacillus sp3</i> (Lp3) et lait stérile sans ferment (C).	26
<b>Figure 7 :</b>	Cinétique de croissance de <i>Enterococcus sp1</i> pendant 4h d'incubation.	28
<b>Figure 8 :</b>	Cinétique de croissance bactérienne au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par <i>Enterococcus sp6</i> (Ent6), <i>Lactobacillus sp1</i> (Lb1), <i>Enterococcus sp3</i> (Ent3), <i>Lactobacillus sp4</i> (Lb4) et <i>Enterococcus sp 1</i> (Ent1).	29
<b>Figure 9 :</b>	Electrophorèse SDS-PAGE des hydrolysats issue des bactéries inoculées dans le milieu lait UHT (37°C/24h, 48h et 72h)	31

<b>Tableau 1 :</b> Comparaison des compositions en énergie, protéines, lipides et acides gras essentiels du lait de femme avec celles du lait de vache et des laits pour nourrissons.	11
<b>Tableau 2 :</b> Comparaison des glucides du lait de femme à ceux du lait de vache et des laits pour nourrissons.	12
<b>Tableau 3 :</b> Comparaison des compositions en sels minéraux du lait de femme avec celles du lait de vache et des laits pour nourrisson.	12
<b>Tableau 4 :</b> Nature des souches lactiques utilisées	15
<b>Tableau 5 :</b> Composition des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE 12%)	18

Liste des figures

Liste des tableaux

## INTRODUCTION

### Partie I : Synthèse bibliographique

1.	les bactéries lactiques	3
1.1	Généralités sur les bactéries lactiques	3
1.1.1	Définition et caractéristiques	3
1.1.2	Habitat et origine	3
1.1.3	Intérêt des bactéries lactiques	4
1.1.3.1	Pouvoir acidifiant	5
1.1.3.2	protéolytique	5
1.1.3.3	Pouvoir antibactérien	5
1.1.3.4	Domaine de la santé	6
1.2	Le lait maternel	7
1.2.1	Définition	7
1.2.2	Composition du lait de femme	7
	• Protéines et substances azotées	7
	• Lipides et digestibilité des graisses	8
	• Glucides et oligosaccharides	10
	• Autres composants du lait de femme	10
1.2.3	les bactéries lactiques du lait maternel	12

### Partie II : Matériels et méthodes

2.1	Echantillons	15
2.2	Les milieux de culture et conditions de croissance :	15
2.3	Vérification de la pureté des souches	15
	• L'examen macroscopique	15
	• L'examen microscopique	15
	• Test de la catalase	15

2.4	La conservation des souches :	16
2.5	Profil fermentaire des bactéries	16
2.5.1	Mesure de la production d'acide lactique	16
	• Principe de mesure	16
	• Procédure	16
2.5.2	Cinétique de croissance des bactéries	17
2.6	Caractérisation biochimique des laits fermentés	18
	• Test sur milieu lait écrémé UHT	18

### **Partie III : Résultats et discussion**

3.1	Vérification de la pureté des souches	20
	• Test macroscopique	20
	• Test microscopique	20
	• Test de la catalase	21
3.2	Résultats des propriétés technologiques des bactéries	21
3.3	Cinétique de croissance des bactéries	27
3.4	Caractérisation biochimique des laits fermentés	30

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**  
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**  
**ANNEXE**

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. Two thin blue lines intersect at a point, forming a V-shape that frames the circles. The circles are positioned at the top, middle, and bottom of the right side.

# **Introduction**

## Introduction générale

---

Le lait maternel est en général, le premier aliment ingéré par les nouveau-nés. Sa composition a une influence directe sur le développement du microbiote intestinal, lequel jouera à son tour un rôle essentiel dans le développement du système immunitaire des nourrissons.

Le lait maternel a un rôle très bénéfique, il contient près de 700 espèces de bactéries différentes (**Raul Cabrera-rubio *et al.* 2012**) il est exempt de  $\beta$ -lactoglobuline, une protéine du lait de vache extrêmement allergisante pour l'être humain elle peut entraîner des réactions très violentes chez les nouveau-nés âgés de moins d'un an.

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sanitaire sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu.

C'est dans ce sens que s'inscrit notre étude dont le but d'étudier et de déterminer les propriétés de ces bactéries par ce présent travail qui vise l'étude des propriétés technologique de quelques souches isolées du lait maternel. Les pouvoirs visés concernent l'activité acidifiante, la diminution du pH, le dénombrement et la dégradation des protéines du lait de vache.

The background features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each composed of concentric rings in different shades of blue. These circles are arranged in a descending sequence from top-right to bottom-right. Two thin, light blue lines intersect at the top-left, forming a large 'V' shape that frames the central text area.

Chapitre 1:  
Revue  
Bibliographique



## 1. les bactéries lactiques

### 1.1 Généralités sur les bactéries lactiques

#### 1.1.1 Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (**Badis et al., 2005**). Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (coques/genre *Streptococcus* et *Lactococcus*...), bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc* ssp.) (**Luquet et Corrieu, 2005; Galvez et al., 2011**).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 4,5.

Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (**Salminen et al., 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011**).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**).

Bien avant que l'on soit conscient de leur existence, les bactéries lactiques, ont toujours été utilisées cependant, comme ferment elles ne sont utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (**Ross et al., 2002**). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19ème siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. **Conn (1889) ; Storch (1890) et Weigmann (1896)**, ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**De Roissart et Luquet, 1994**).

#### 1.1.2 Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter

à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé). (Bergey's manual, 2009) Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

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

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja) (Bekhouche, 2006).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages, dans les laits fermentés dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (Demazeaud, 1996).

### 1.1.3 Intérêt des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Belyagoubi, 2014).

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (Makhloufi, 2011).

Parmi leurs intérêts :

#### **1.1.3.1 Pouvoir acidifiant**

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Mäyrä-mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008**).

Afin de réaliser une caractérisation technologique des souches, il est utile de mesurer l'activité acidifiante des bactéries en reproduisant l'évolution thermique du fromage (**Chamba et Prost, 1989**). Pour mesurer l'activité acidifiante des bactéries dans le lait, la destruction préalable de la flore contaminante est nécessaire (**Chavarri *et al.*, 1983**).

*L. lactis* subsp. *lactis*, ssp. *cremoris* et biovar. *diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (**Casalta *et al.*, 1995 ; Lafarge *et al.*, 2004**).

#### **1.1.3.2 protéolytique**

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés, ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (**Lynch *et al.*, 1997 ; Lane et Fox, 1996 ; Farkye *et al.*, 1995**). Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Donkor *et al.*, 2007 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Roudj *et al.*, 2009**).

#### **1.1.3.3 Pouvoir antibactérien**

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (**Caridi *et al.*, 2003**). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyle et des bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Le peroxyde d'hydrogène, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase ; son pouvoir oxydatif provoque l'oxydation des lipides et la libération des acides nucléiques (**Block, 1991**). Le dioxyde de carbone, formé au cours de la fermentation hétérolactique, crée un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies (**Eklund, 1984**). Les acides organiques, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. En diffusant à travers les couches lipidiques de la membrane bactérienne, ils provoquent un abaissement du pH interne par libération de protons, déstabilisant ainsi le fonctionnement de la cellule bactérienne (**Booth, 1985**).

#### **1.1.3.4 Domaine de la santé**

Les bactéries lactiques forment un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits (**Klaenhammer et al., 2007**). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acide lactique et acétique), enzymes (lactase) et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (**Soomro et al., 2002**).

Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (**Khan et Ansari, 2007**). Les lactobacilles ont été incorporés dans des laits fermentés (**Heller, 2001 ; Oliveira et al., 2001**) et des fromages (**Gomes et Malcata, 1998 ; Nayra et al., 2002**)

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**). **Uehara et al. (2006)** ont démontré pouvoir anti inflammatoire de *Lactobacillus crispatus* , qui est utilisée sous forme de suppositoire pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

## 1.2 Lait maternel

### 1.2.1 Définition

Le lait maternel est un liquide biologique complexe qui comprend des milliers de constituants. La composition du lait maternel, comme celui de tous les mammifères, est spécifique de l'espèce et adaptée aux besoins particuliers du petit humain. Il contient des macronutriments (protéines, lipides et glucides), des micronutriments (minéraux et vitamines) et de très nombreux facteurs biologiquement actifs. Ensemble, ils assurent la nutrition du nouveau-né mais aussi des mécanismes anti-infectieux, anti-inflammatoires, antioxydants, d'immunomodulation, trophiques et de protection de la muqueuse intestinale.

Le lait maternel joue également un rôle important dans l'initiation, le développement et la composition de la microflore intestinale du nouveau-né, grâce à ses composants pré- et probiotiques (M. Tackoen ., 2012) ..

### 1.2.2 Composition du lait de femme

- **Protéines et substances azotées**

La teneur en protéines du lait de femme est remarquablement faible, entre 8 et 12 g/l, ce qui suppose une excellente absorption et une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés avec les besoins du nourrisson. On peut citer en exemple ses teneurs relativement plus faibles en phénylalanine, tyrosine et méthionine et plus fortes en taurine et en cystéine, bien adaptées aux immaturités enzymatiques du nouveau-né, qui limitent chez lui certaines capacités de conversion, comme celles de la méthionine en cystéine et en taurine. Les protéines du lait de femme sont aussi très spécifiques ; même les caséines, qui ne représentent que 40 % des protéines (contre 80 % dans le lait de vache et les laits pour nourrissons à protéines non modifiées), sont différentes. Les caséines du lait de femme forment des micelles beaucoup plus petites que celles du lait de vache et des laits adaptés. Il s'agit surtout de caséine<sup>2</sup> dont l'hydrolyse conduit à des peptides (caséomorphines) à propriétés opioïdes et de la caséine<sup>°</sup> hautement glycosylée dont la fraction C terminale a des effets bifidogènes (Salle BL 1993, Hamosh M.,2000). Enfin, un pourcentage élevé (60 %) de protéines ne précipitent pas avec les caséines ; elles sont dites "protéines solubles". Ce pourcentage élevé de protéines solubles et les micelles de caséine de petite taille expliquent la coagulation plus fine du lait de femme dans l'estomac du nourrisson, contribuant à sa vidange plus rapide.

Parmi ces protéines solubles, certaines ont des rôles fonctionnels essentiels, comme les immunoglobulines, en particulier les IgAs de type sécrétoire (0,5 à 1 g/l) (**Hamosh M.,2000**), la lactoferrine, le lysozyme, la bêta-défensine 1 ( **Jia HP.,et al 2001**), des enzymes (en particulier une lipase), des facteurs de croissance, comme l'*insuline-like growth factor* (IGF1), le *transforming growth factor* (TGF), les facteurs de croissance leucocytaire (G-CSF) et, surtout, l'*epidermal growth factor* (EGF), qui a une action trophique sur les muqueuses gastrique et intestinale. On y trouve aussi de l'érythropoïétine (**Kling PJ.,2002**), des protéines de liaison des folates, des vitamines B12 et D, de la thyroxine et des corticostéroïdes et différentes cytokines, aussi bien pro-inflammatoires (TNF $\pm$ , IL1 $^2$ , IL6, IL8, IL12, IL18, MIF) qu'anti-inflammatoires (IL10 ; TGF $^2$  2), dont la signification physiologique reste à préciser (**Hamosh M.,2000**). À côté des protéines, la somme des peptides, des acides aminés libres (dont la taurine), de l'urée, de l'acide urique, des sucres et alcools aminés, des polyamines, des nucléotides et de la carnitine représente 20 à 25 % de l'azote total du lait, alors qu'elle ne constitue que 3 à 5 % de cet azote dans le lait de vache et les laits adaptés. L'intérêt nutritionnel de certains de ces composés, comme la carnitine et les nucléotides, est bien démontré.

- **Lipides et digestibilité des graisses**

Alors que la teneur en lipides (35 g/l en moyenne) est proche de celle du lait de vache, on sait, depuis longtemps, que la digestibilité et le coefficient d'absorption des graisses du lait de femme sont très supérieurs (80 % versus 60 % dans les premiers jours et atteignant rapidement 95% alors qu'il reste à 80 % à 3 mois pour le lait de vache). On sait aujourd'hui que, pour l'essentiel, la meilleure digestibilité des graisses du lait de femme tient à la présence en son sein d'une lipase dépendante des acides biliaires qui compense au niveau duodénal le défaut de lipase pancréatique ( **Hamosh M.,2000**) ; s'y ajoute la structure différente des triglycérides. Soixante-dix pour cent de l'acide palmitique (25 % des acides gras totaux) étant en position 2 sur le glycérol, ils sont bien absorbés sous forme de monoglycéride, ce qui n'est pas le cas pour le lait de vache. Ce n'est pas non plus le cas des lipides d'origine végétale qui remplacent aujourd'hui, en tout ou en partie, les graisses lactiques dans les formules pour nourrissons.

Ce remplacement des graisses lactiques par un mélange de graisses végétales dans les laits pour nourrissons est bien entendu effectué pour assurer les apports indispensables en

acides gras essentiels, acide linoléique (chef de file de la série “n-6”) et acide  $\pm$  linoléique (chef de file de la série “n-3”) dans un rapport satisfaisant (entre 5 et 15). Il en résulte cependant des désavantages à plusieurs égards. Le lait de femme est riche en cholestérol (2,6 à 3,9 mM/l) alors que le lait de vache en apporte peu (0,3 à 0,85 mM/l) et que les laits pour nourrissons, à 100 % d’huiles végétales, n’en apportent pas du tout. La cholestérolémie est d’ailleurs plus élevée chez le nourrisson au sein. Si les conséquences de ces faits ne sont pas aujourd’hui évidentes, il faut rappeler le rôle du cholestérol dans la structure des membranes, comme précurseur hormonal et dans le développement cérébral. Dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, la carence très précoce, in utero, en cholestérol endogène entraîne un syndrome malformatif grave dominé par une arriération mentale sévère. Les effets à long terme de l’absence de cholestérol dans les laits pour nourrisson ne sont pas aujourd’hui apparents.

L’hypothèse selon laquelle une cholestérolémie plus élevée de l’enfant au sein contribuerait à une maturation des récepteurs aux LDL et à une cholestérolémie plus basse à long terme reste discutée. Une revue récente des études publiées conclut cependant (**Owen CG., et al 2002**) à une baisse du cholestérol total et du LDL-cholestérol à long terme, chez les enfants ayant été nourris au sein, avec un effet bénéfique sur l’avenir cardiovasculaire.

Un deuxième inconvénient possible concerne les acides linoléiques conjugués (CLA), essentiellement le 9 *cis* 11 *trans* 18:2 et d’autres isomères. Ces CLA sont présents dans le lait de vache (3,4 à 6,4 mg/g de graisse) ; ils résultent de la biohydrogénation partielle de l’acide linoléique dans le rumen. Ils sont également présents dans le lait de femme, en plus faible concentration (3,8  $\pm$  0,3 mg/g de graisse), au prorata de la consommation de produits laitiers, mais sont totalement absents des laits adaptés à 100 % de lipides végétaux, comme l’autorise la réglementation.

Différentes études ont montré que ces CLA exerçaient un effet protecteur vis-à-vis de différentes tumeurs cutanées et mammaires induites expérimentalement chez l’animal, de même qu’un effet protecteur vis-à-vis de l’athérosclérose chez le hamster par baisse du LDL-cholestérol et qu’ils auraient, enfin, des propriétés anti-oxydantes (**Bélury MA.,1995**). Il est difficile, aujourd’hui, de transposer ces résultats chez l’homme et d’affirmer qu’un manque de CLA pendant les 4 à 6 premiers mois de la vie pourrait avoir de tels effets négatifs à long terme.

Beaucoup plus importante est la présence dans le lait de femme des acides gras poly-insaturés (AGPI), acides gras essentiels mais aussi leurs homologues supérieurs, en particulier l'acide arachidonique (AA : 0,46 g/ 100 g d'acides gras) dans la série linoléique et l'acide docosa-hexaénoïque (DHA : 0,25 g/100 g d'acides gras) dans la série  $\pm$  linoléique en raison de leurs fonctions aux niveaux cérébral et rétinien (**Heird WC.,2000**). Ils sont totalement absents des formules pour nourrissons, à l'exception de l'une d'entre elles. Leur rôle démontré dans les processus de maturation cérébrale et rétinienne, l'immaturité des processus d'élongation et surtout de désaturation qui permettent leur synthèse à partir des deux acides gras essentiels (**Reynolds A., 2000**) ont conduit à un consensus sur la nécessité d'une supplémentation spécifique et équilibrée en AA et en DHA des formules pour prématurés. Bien que certains travaux plaident dans ce sens, la nécessité de supplémenter de la même façon les laits de premier âge n'est pas prouvée ; cette supplémentation entraînerait sans aucun doute une augmentation du coût de ces laits.

- **Glucides et oligosaccharides**

Globalement, le lait de femme définitif comporte 75 g/l de glucides dont 63 g de lactose et 12 g d'oligosaccharides, alors que le lait de vache ne comporte que du lactose, les laits pour nourrissons pouvant comporter, dans des limites réglementairement fixées, d'autres sucres, comme la dextrine-maltose. Ces oligosaccharides constituent une autre originalité majeure du lait de femme (**Gnoth MJ et al., 2000**). Constitués de cinq sucres élémentaires de structure ramifiée (glucose, galactose, N-acétylglucosamine, fucose, acide sialique), ils sont au nombre de plus de 130 et représentent de véritables prébiotiques. Non digestibles au niveau du grêle (**Gnoth MJ et al., 2000**), ils jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'écosystème bactérien colique dominé, chez l'enfant nourri au sein, par les bifidobactéries, en particulier *bifidobacterium bifidum*.

Le rôle des ces oligosaccharides (pratiquement totalement absents du lait de vache et des formules pour nourrissons) dans la protection vis-à-vis des infections digestives, mais aussi extradiigestives, est aujourd'hui de plus en plus argumenté (**Kunz C et al.,2000**).

- **Autres composants du lait de femme**

Il n'est pas de notre propos de détailler tous les nutriments du lait de femme, d'autant qu'en ce qui concerne les minéraux et les micronutriments (vitamines et oligoéléments), les possibilités technologiques permettent d'optimiser les valeurs de ces constituants dans les

lait pour nourrissons. Les **tableaux 1, 2 et 3** fournissent des éléments comparatifs entre lait de femme, lait de vache et laits pour nourrissons actuellement commercialisés.

Il faut souligner cependant les différences de biodisponibilité qui peuvent exister pour différents oligo-éléments, comme le fer et le zinc, en raison des “ligands” présents dans le lait de femme et qui facilitent leur absorption. Ainsi, malgré une teneur relativement faible en fer, le coefficient d’absorption élevée (60 % versus 20 % pour le fer du lait de vache) assure un statut martial suffisant chez l’enfant au sein. En cas d’allaitement maternel exclusif, prolongé au-delà de 6 mois, une supplémentation en fer devient cependant nécessaire.

Il faut enfin insister sur le rôle antiinfectieux joué par les cellules immuno-compétentes (2 à 300 000/ml) et leurs cytokines, qu’il s’agisse de lymphocytes T (interleukines 2, 3, 4, 10 ; interféron<sup>3</sup>), de lymphocytes B (IgAs, IgG, IgM) et de macrophages.

**Tableau 1** : Comparaison des compositions en énergie, protéines, lipides et acides gras essentiels du lait de femme avec celles du lait de vache et des laits pour nourrissons.

Pour 100 ml	Lait de vache	Laits pour nourrissons		Lait de femme
<b>Poudre (g)</b>		12,6 à 15		
<b>Calories (kcal)</b>	65	66 à 73		68
<b>Protides (g)</b>	3.7	1,5 à 1,9		1
<b>Caséine (%)</b>	80	60 à 80*	44 à 50**	40
<b>Lipides (g)</b>	3.5	2,6 à 3,8		3,5
<b>A. linoléique (mg)</b>	90	350 à 740		350
<b>A. ± linoléique (mg)</b>	Trace	30 à 100		37
* Laits à protéines non modifiées ; ** Laits à protéines adaptées.				

**Tableau 2 :** Comparaison des glucides du lait de femme à ceux du lait de vache et des laits pour nourrissons.

Pour 100 ml	Lait de vache	Laits pour nourrissons	Lait de femme
Glucides (g)	4,5	6,7 à 9,5	7,5
Lactose (%)	100	47 à 100	68
Dext-maltose (g)	0	1,1 à 2,6	1
Autres sucres	0	Amidon, glucose, fructose, saccharose	Oligosaccharides

**Tableau 3 :** Comparaison des compositions en sels minéraux du lait de femme avec celles du lait de vache et des laits pour nourrisson.

Pour 100 ml	Lait de vache	Laits pour nourrissons	Lait de femme
Sels minéraux (mg)	900	250 à 500	210
Sodium (mg)	48	16 à 28	16
Calcium (mg)	125	43 à 93	33
Ca/P	1,25	1,2 à 1,9	2
Fer (mg)	0,03	0,7 à 1	0,05

### 1.2.3 les bactéries lactiques du lait maternel

Des chercheurs suisses viennent de mettre en évidence un nouveau rôle bénéfique de l'allaitement. Ils ont montré que le lait maternel contenait les bactéries nécessaires à l'implantation d'une flore intestinale protectrice.

Des travaux précédents avaient d'ailleurs montré que le lait maternel était loin d'être stérile, mais qu'il contenait près de 700 espèces de bactéries différentes. Par des méthodes de culture classiques et de séquençages, les chercheurs ont analysé les microbiotes intestinaux de sept mamans et de leurs bébés, ainsi que les bactéries contenues dans leurs laits. Ils ont alors identifié certaines espèces bactériennes, appartenant aux genres

*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* et *Clostridium*, présentes dans tous les types d'échantillons. Ainsi, en se nourrissant de lait maternel, les bébés ingéraient

des micro-organismes destinés au développement d'une flore intestinale favorable (**Agnès Roux., 2013**).

Cependant, l'utilité précise de ces bactéries reste encore énigmatique. La poursuite de ces travaux permettrait de mieux définir l'intérêt de la diversité microbienne du lait maternel. Ils pourraient également conduire à la mise en place d'un lait industriel enrichi en bactéries, plus proche de celui fabriqué naturellement par les mamans. Cela aiderait peut-être les bébés nourris au biberon à mieux lutter contre les allergies par exemple. Même s'il est scientifiquement prouvé que le lait maternel est le meilleur mode d'alimentation pour un bébé. Rappelons qu'il existe des laits industriels de bonne qualité, que le choix du mode d'allaitement doit rester libre et personnel et ne doit en aucun cas être jugé.

La composition du lait maternel humain est dominé par les bacilles, qui représentent 77% Du nombre total de séquences obtenues Au colostrum, les genres les plus communs étaient *Weissella* et *Leuconostoc* (Deux bactéries lactiques de l'ordre Lactobacillales) ont suivi Par *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Lactococcus* (**Raul Cabrera-rubio et al. 2012**).

Au cours du temps, de nombreuses études ont permis de montrer que des bactéries étaient présentes dans le lait maternel à une concentration de  $10^3 - 10^4$  UFC /ml. Jusqu'ici, on pouvait identifier deux à dix-huit souches bactériennes différentes par individu, notamment *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les espèces les plus souvent isolées dans le lait maternel sont *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus*, *Strep. mitis*, *Strep. salivarius*, *L.salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *B. breve* et *B. bifidum*. Des études récentes sont parvenues à mettre en lumière jusqu'à 700 espèces différentes de bactéries.

Des différences d'une mère à l'autre Grâce à de toutes nouvelles méthodes d'analyse, nous pouvons désormais établir une image plus claire de la composition bactérienne du lait maternel. Il est aujourd'hui admis que la composition bactérienne se modifie tout au long de la lactation, mais qu'il existe un microbiome de base qui reste constant, à l'image de la colonisation bactérienne dans d'autres régions de l'organisme. En outre, il semble que la composition microbienne du lait maternel soit vraiment propre à chaque femme et influencée par son état de santé et son poids, ainsi que par le mode d'accouchement (**Dr.Med .Christopher., 2013**).

The background features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a darker blue center and a lighter blue outer ring. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin, light blue lines intersect at the top left, forming a V-shape that frames the circles. The text 'Chapitre 2 : matériel et méthodes' is positioned to the left of the circles.

## Chapitre 2 : matériel et méthodes



## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Echantillons

Dans cette étude, les échantillons du lait de 10 femmes étaient collectés auprès des différentes polycliniques de la région oranaise.

- **Les souches utilisées**

Notre travail a porté sur 10 bactéries lactiques isolées du lait maternel. Elles sont représentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 4:** Nature des souches lactiques utilisées.

Souches	Genre
1	<i>Enterococcus sp1</i>
2	<i>Enterococcus p2</i>
3	<i>Enterococcus sp3</i>
4	<i>Lactobacillus sp1</i>
5	<i>Enterococcus sp4</i>
6	<i>Enterococcus sp5</i>
7	<i>Lactobacillus sp2</i>
8	<i>Lactobacillus sp3</i>
9	<i>Lactobacillus sp4</i>
10	<i>Enterococcus sp6</i>

### 2.2 Les milieux de culture et conditions de croissance :

Les cultures des bactéries utilisées ont été réalisées en milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS) à 37°C, ce dernier subit une stérilisation de 20 min à 120°C par autoclave.

### 2.3 Vérification de la pureté des souches :

Les souches sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu MRS solide pour avoir des colonies bien séparées. Après incubation à 37°C pendant 24h, différents examens sont effectués.

- **L'examen macroscopique :** concerne les colonies bactériennes : taille, couleur et forme.
- **L'examen microscopique :** est réalisé suite à une coloration de Gram qui permet de déceler le Gram des bactéries, la morphologie des cellules, leur taille et leur mode de regroupement. (voir annexe).
- **Test de la catalase :** La recherche de la catalase est effectuée par addition d'une goutte de peroxyde d'hydrogène à une colonie étalée sur une lame. Le dégagement de bulles d'air indique que l'isolat est catalase positif ; dans le cas contraire, la souche est catalase négatif.

## 2.4 La conservation des souches

Les souches sont cultivées dans MRS liquide après 24h d'incubation les tubes eppendorfs contenant les souches sont conservés à 4°C.

## 2.5 Profil fermentaire des bactéries

Ces analyses reposent sur l'étude des paramètres suivants ; pH, acidité titrable. Chaque essai est répété cinq fois.

### 2.5.1 Mesure de la production d'acide lactique

Le taux de production d'acide est considéré comme le reflet de l'activité du ferment (Stadhouders, 1986).

- **Principe de mesure**

L'expression "acidité titrable" désigne l'acidité mesurée par la méthode classique de la réaction acide-base selon la méthode décrite par **Accolas et al., (1977)**. Cette méthode permet de neutraliser l'acide produit par la fermentation par une solution de NaOH (N/9) en présence de phénolphtaléine (à 1% dans de l'alcool). La solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) utilisée est dite soude dornic.

La mesure de l'acidité titrable est faite au début de la fermentation du lait (T=0) puis toutes les heures jusqu'à quatre heures. Les mesures sont effectuées dans le lait fermenté, par les cultures pures prises individuellement.

- **Procédure**

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude.

On commence par la préparation de lait écrémé dans des flacons de capacité 250mL. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon estensemencé par une culture lactique (V/10V). Après incubation à 45°C dans un bain marie, à un intervalle du temps 1 h, 2 h, 3 h et 4 h; 10 mL du lait est prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) , à l'aide d'une burette graduée et sous agitation, en présence de 5 gouttes de

phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (LARPENT, 1997).

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

1 °D correspond à 0,1g d'acide lactique produit dans un litre de lait.

Où :

**V NaOH:** Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10 mL de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

### 2.5.2 Cinétique de croissance des bactéries

La cinétique de croissance (Ufc/mL) est réalisée sur des laits fermentés par les souches pures. Une série de dilution décimale dans de l'eau physiologique stérile est réalisée, ensuite les trois dernière dilutions ont été ensemencées en profondeur sur gélose MRS puis incubé à 37° C pendant 14 h à 48h.

Le dénombrement est effectué dans des boîtes de pétri contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 (Ghoddusi & Robinson, 1996).

Le nombre de colonies par boîte est évalué en UFC (unité formant colonie) par grammes d'échantillon selon la formule suivante (GUIRAUD, 2003) :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

**N :** Nombre d'UFC par grammes de produit initial.

• **c:** Nombre de colonies comptées par boîte de Pétri.

**n1, n2 :** Nombre de boîtes de Pétri.

**d :** Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

## 2.6 Caractérisation biochimique des laits fermentés

- **Test sur milieu lait écrémé UHT**

Les différents isolats ont été réactivés deux fois par mélange de 5% de préculture dans du lait UHT écrémé puis incubés à 37°C pendant 24, 48 et 72 h ((El-Ghaish et *al.*, 2010). Le mélange a été dilué au 1/10 (V/V) dans du tampon d'échantillon contenant 4% de dodécyl sulfate de sodium(SDS), 3% de 2-mercaptoéthanol, 20% de glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8 puis chauffé à 100°C pendant 3min, analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS- PAGE) (Laemmli, 1970). Voir annexe

The background features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each composed of concentric rings in different shades of blue. These circles are arranged along a diagonal line that runs from the top-left towards the bottom-right. The largest circle is at the top-right, a medium-sized one is in the center, and a large one is at the bottom-right. The text is positioned to the left of the middle circle.

# Chapitre 3 : Résultats et discussion



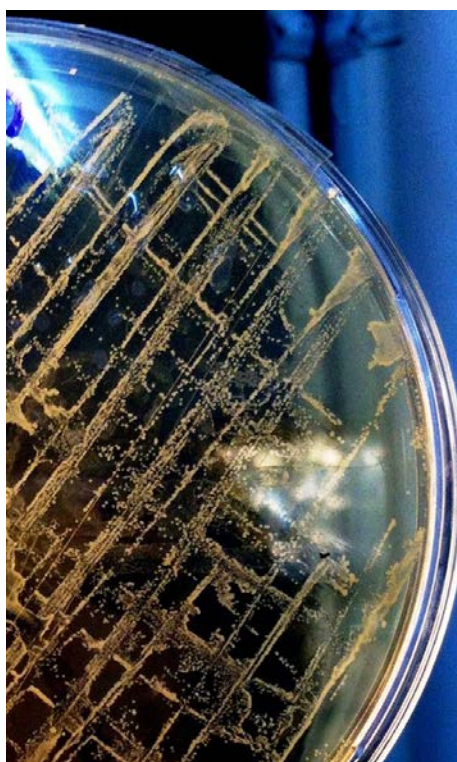
### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 Vérification de la pureté des souches

- **Test macroscopique**

Un total de dix souches ont été purifiées sur milieu MRS. La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides MRS après 24 h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

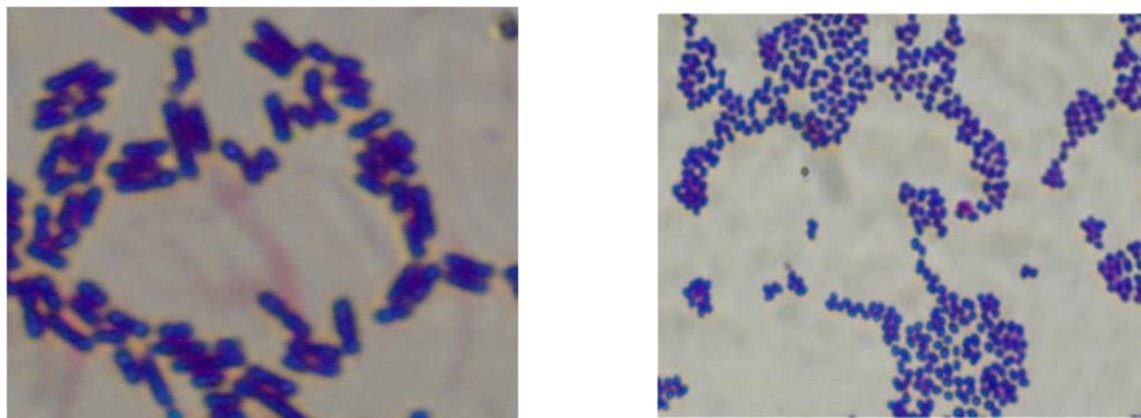
L'observation macroscopique des différentes souches utilisées montre des colonies de petite taille, de couleur blanchâtre, ronde de surface lisse et au contour régulier (**Figure 1**).



**Figure1** : Aspect macroscopique des colonies par ensemencement en surface.

- **Test microscopique**

L'observation microscopique a révélé plusieurs formes de cellules violettes ; cocci, bacilles de différentes tailles et ovoïdes. Ces formes sont disposées en paire ou en chaînettes plus ou moins longues. La coloration de Gram a montré que toutes les souches sont des bactéries à Gram positif (**Figure 2**).



**Figure 2** : Aspect microscopique des cellules (Grossissement 10x100) après coloration de Gram

- **Test de la catalase**

Les bactéries ne possèdent pas d'activité catalasique (absence de bulles). Elles sont dites catalase négatives.

Ces caractéristiques permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques.

### **3.2 Résultats des propriétés technologiques des bactéries :**

L'un des objectifs de notre travail est d'évaluer les propriétés technologiques de ces bactéries en étudiant l'activité protéolytique et le pouvoir acidifiant.

Parmi les propriétés biotechnologiques, on trouve le pouvoir acidifiant qui est basé sur la conversion des carbohydrates en acide lactique. Cette conversion compte parmi les plus importantes étapes pour l'industrie agro-alimentaire. Les laits fermentés sont des produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait (**Béal, 2012**). La croissance des bactéries lactiques est caractérisée par la formation de composés acides comme l'acide lactique, qui s'accumulent dans leur environnement au cours de la fermentation. C'est d'ailleurs cette production de composés organiques qui rend le milieu acide défavorable à la croissance des autres microorganismes.

Parmi les 10 souches testées, nous avons sélectionné cinq souches fortement protéolytiques ( Ent1 , Lb1 , Lb4 , Ent6, Ent4) comme souches représentatives qui ont montré une bonne cinétique d'acidification , et cinq souches faiblement protéolytique ( Ent3 , Ent5 ,Lb2, Lb3 ,Ent2 )

Concernant le pouvoir acidifiant nous remarquons que le taux d'acidité diffère en fonction de la souche.

Le meilleur résultat a été obtenu par la souche LB4 dont l'activité maximale atteint 40° D suivi par Ent6 et Ent1 et Entr4, le taux d'acidité se situe entre 35°D et 40°D (**figure 5 et 6**). Cependant chez les souches Lb2, Lb3 et Ent5 il n'y'a pas une grande différence entre T0 et T4, ces dernière sont peu active (**figure 6**).

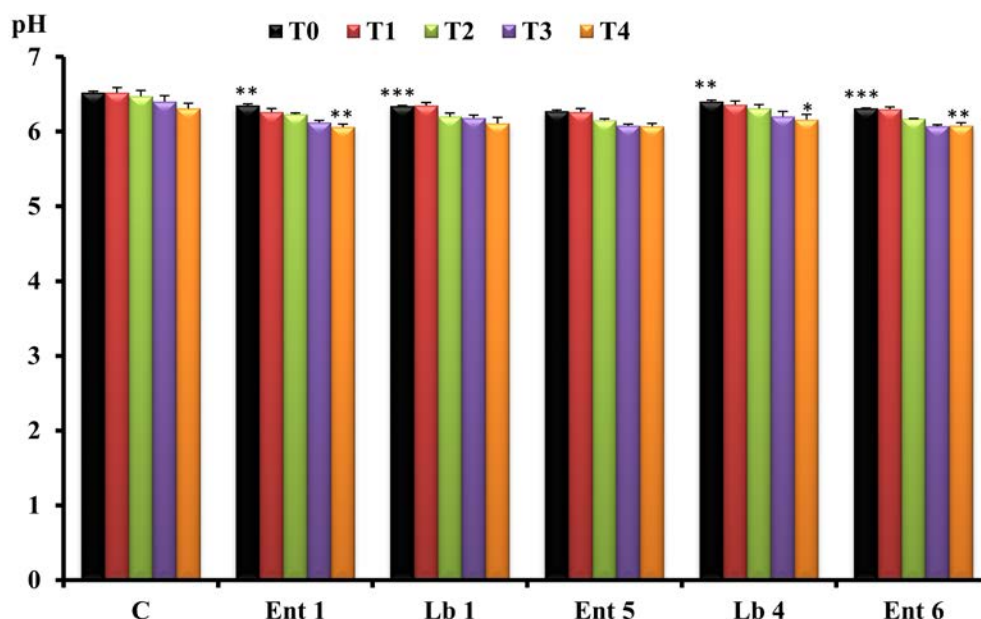
L'évolution de pH pendant 4h de fermentation par ces souches mentionné ci-dessus est présentée **dans les figure 3 et 4**

La valeur notée étant comprise entre 6,5 et 5,9. Ces valeurs de pH sont dues à l'augmentation de la teneur de l'acide lactique produit par ces bactéries. Il existe une relation étroite entre le pH et le degré Dornic ; quand le pH diminue la quantité d'acide lactique augmente.

Nos résultats sont en accord avec ceux présenter par **Chougrani et al (2007)** et **Loumani et al (2010)** qui ont obtenus après 4h d'incubation un pH compris entre 6,5 et 5,8 chez les lactobacilles.

D'une manière générale on remarque que l'activité acidifiante diffère selon les germes et les espèces et parfois au sein de la même espèce.

Au cours de la fermentation du lait à 45°C, nous avons obtenu une quantité importante d'acide ce qui entraine une baisse considérable de pH chez certaines souches étudiées. Ce résultat indique que certains de nos souches a un très bon profil fermentaire mais à des niveaux différents. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Chekroun et al. (2011)** et **Pereira de Souza et al. (2013)**. Ces variations imputables au développement des bactéries lactiques conduisent à l'acidification du milieu par la production d'acide lactique d'où la baisse du pH du lait (**Chekroun et al., 2011**).



**Figure 3:** Cinétique de variations du pH au cours de la fermentation de lait de vache à 45°C par *Enterococcus sp1* (Ent1), *Lactobacillus sp1* (Lb1), *Enterococcus sp5* (Ent5), *Lactobacillus sp4* (Lb4) et *Enterococcus sp 6* (Ent6) et lait stérile sans ferment (C).

**T0 :** début de la fermentation

**T1 :** 1 heures

**T2 :** 2 heures

**T3 :** 3 heures

**T4 :** 4 heures

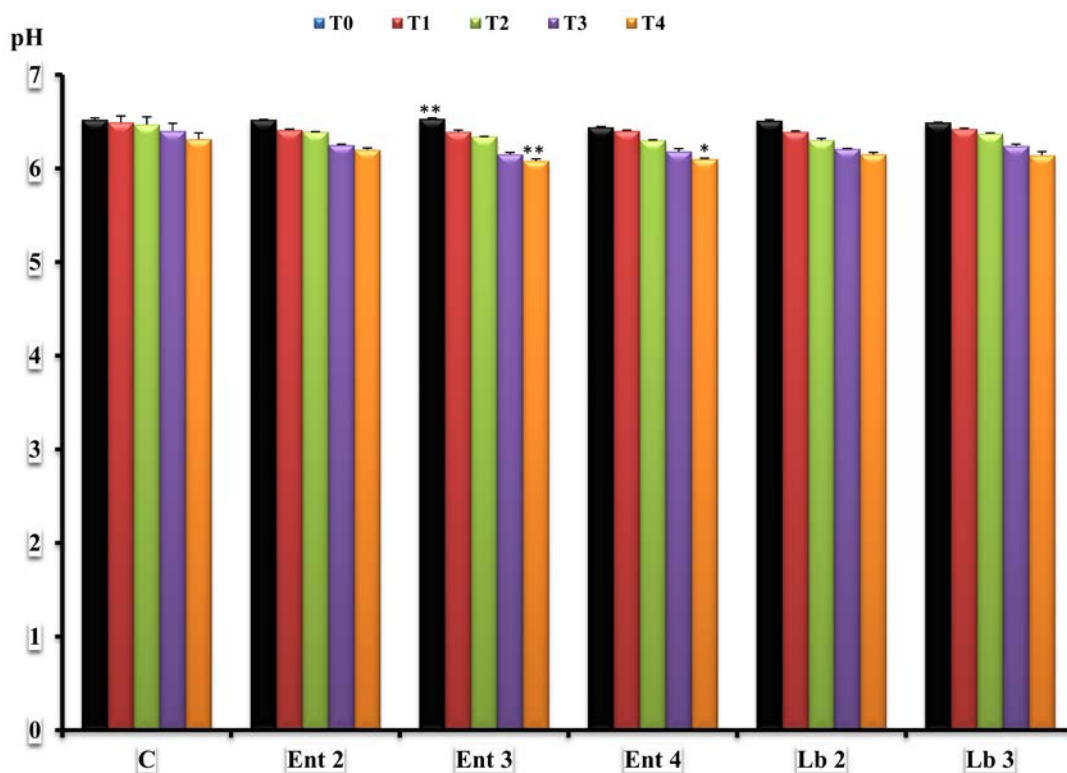
Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard. (n=5).

\*\*\* :  $C_{t_0}$  vs  $Lb1_{t_0}$  ( $p < 0,0001$ ) ; \*\*\* :  $C_{t_0}$  vs  $Ent6_{t_0}$  ( $p < 0,0001$ ).

\*\* :  $C_{t_4}$  vs  $Ent1_{t_4}$  ( $0,001d \text{ p d } 0,01$ ) ; \*\* :  $C_{t_4}$  vs  $Ent6_{t_4}$  ( $0,001d \text{ p d } 0,01$ ) ;

\* :  $C_{t_4}$  vs  $Lb4_{t_4}$  ( $p < 0,05$ )

- Nous notons qu'il y a une différence très significative entre le début de la fermentation du lait stérile ( $t_0$ ) et les autres souches sauf pour *Enterococcus sp5* ( $t_0$ ).
- A la fin de la fermentation, la différence est très significative ( $0,001d \text{ p d } 0,01$ ) chez *Enterococcus sp1* et *Enterococcus sp 6* par rapport au lait stérile (C)



**Figure 4:** Cinétique de variations du pH au cours de la fermentation de lait de vache à 45°C par *Enterococcus sp2* (Ent2), *Enterococcus sp3* (Ent3), *Enterococcus sp4* (Ent4), *Lactobacillus sp2* (Lb2) et *Lactobacillus sp3* (Lp3) et lait stérile sans ferment (C).

**T0 :** début de la fermentation

**T1 :** 1 heures

**T2 :** 2 heures

**T3 :** 3 heures

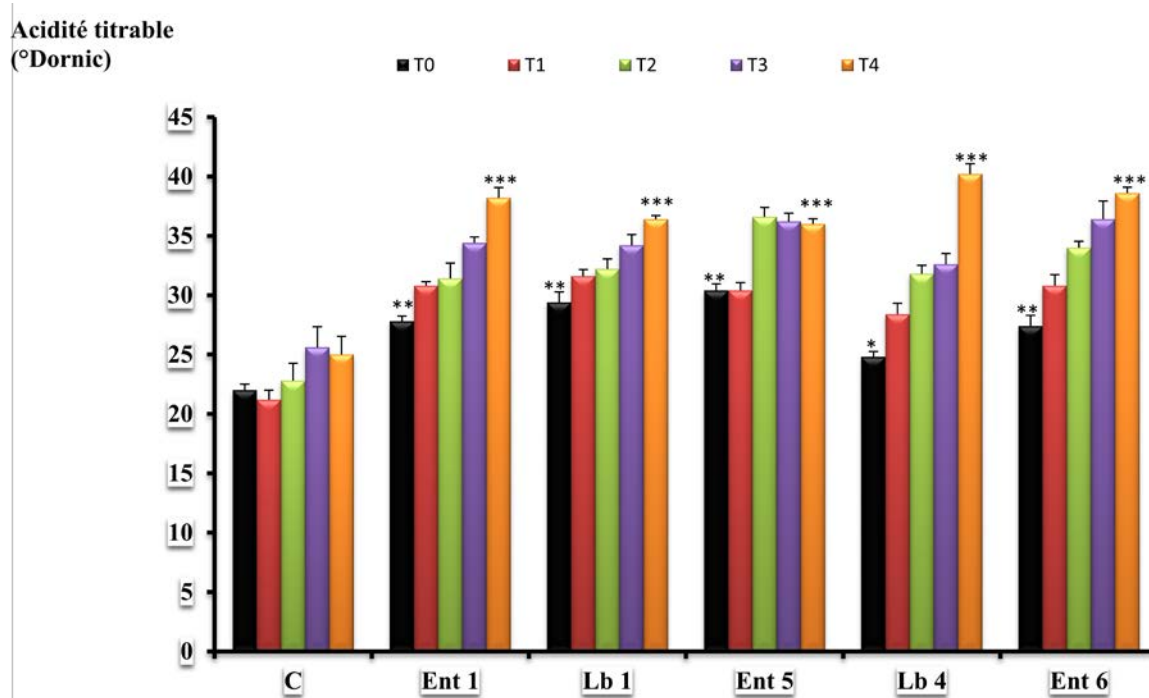
**T4 :** 4 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard. (n=5).

\*\* : C<sub>t0</sub> vs Ent3<sub>t0</sub> (0,001d p d 0,01); \*\* : C<sub>t4</sub> vs Ent3<sub>t4</sub> (0,001d p d 0,01) ;

\* : C<sub>t4</sub> vs Ent4<sub>t4</sub> (p<0,05).

- Nous notons qu'il y a une différence significative entre t<sub>0</sub> du lait stérile et t<sub>0</sub> de *Enterococcus sp3*.
- A la fin de la fermentation, la différence est très significative (0,001d p d 0,01) entre *Enterococcus sp3* (Ent3) et le lait stérile (C). cette différence est significative (p<0,05) entre *Enterococcus sp4* (Ent4) et le lait stérile (C)



**Figure 5:** Cénitique de production de l'acide lactique au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par *Enterococcus sp1* (Ent1), *Lactobacillus sp1* (Lb1), *Enterococcus sp5* (Ent5), *Lactobacillus sp4* (Lb4) et *Enterococcus sp 6* (Ent6) et lait stérile sans ferment (C).

**T0 :** début de la fermentation

**T1 :** 1 heures

**T2 :** 2 heures

**T3 :** 3 heures

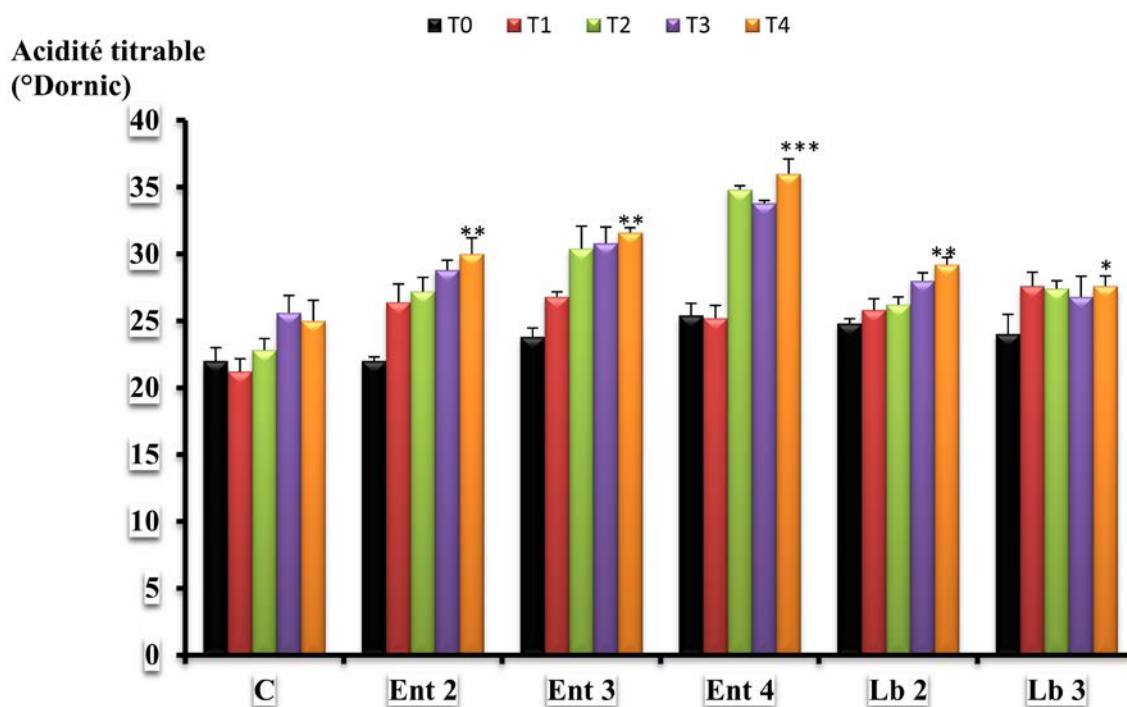
**T4 :** 4 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard. (n=5).

\*\* :  $C_{t0}$  vs  $Ent5_{t0}$  (0,001d p d 0,01) ; \* :  $C_{t0}$  vs  $Lb1_{t0}$  (p<0,05).

\*\*\* :  $C_{t4}$  vs  $Ent1, Lb1, Ent5, Lb4, Ent6_{t4}$  (p < 0,0001).

- Au début de la fermentation, la différence est significative entre le lait stérile sans ferment (C) et les autres laits fermentés par les bactéries lactiques.
- A la fin de la fermentation, la différence est très significative entre le lait stérile et le lait fermenté par les différentes souches bactérienne..



**Figure 6:** Cénitique de production de l'acide lactique au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par *Enterococcus sp2* (Ent2), *Enterococcus sp3* (Ent3), *Enterococcus sp4* (Ent4), *Lactobacillus sp2* (Lb2) et *Lactobacillus sp3* (Lp3) et lait stérile sans ferment (C).

**T0 :** début de la fermentation

**T1 :** 1 heures

**T2 :** 2 heures

**T3 :** 3 heures

**T4 :** 4 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard. (n=5).

\*\*\* : ( $t_0$ ) vs ( $t_4$ ) ( $p < 0,0001$ ).

- Nous notons qu'il y a de différence significative entre le lait stérile sans

ferment (C) et les autres laits fermentés par les différentes souches dont la meilleur acidité est obtenue chez Ent4 .

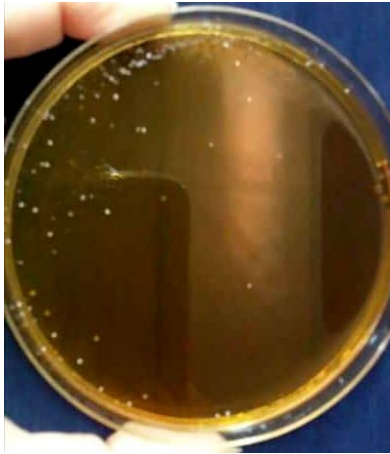
### 3.3 Cinétique de croissance des bactéries :

Afin de montrer l'augmentation de la concentration bactérienne nous avons réalisé un dénombrement pour les souches qui ont un meilleur pouvoir acidifiant et les résultats obtenus sont présentés sous forme de graphe (**figure 8**)

Nous avons enregistré une bonne croissance bactérienne après 4h de fermentation, de plus que le temps de fermentation augmente la concentration bactérienne augmente

Il existe une relation directe entre le temps de fermentation et la croissance bactérienne par exemple la souche Ent1 en (T0 ,T1 ,T2 ,T3 ,T4 )atteint respectivement les valeurs de l'ordre de (  $30 \times 10^7$  ,  $70 \times 10^7$  ,  $90 \times 10^7$  ,  $116 \times 10^7$  ,  $125 \times 10^7$  UFC/mL ).

A la fin de la fermentation, nous observons une augmentation de la concentration bactérienne dans les laits fermentés par les souches étudiées. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Dib et al., (2012)**, **Pereira de Souza et al., (2013)**, qui ont montré que *L. plantarum* et *L. paracasei* présentent une forte croissance dans le lait.



T0



T1



T2

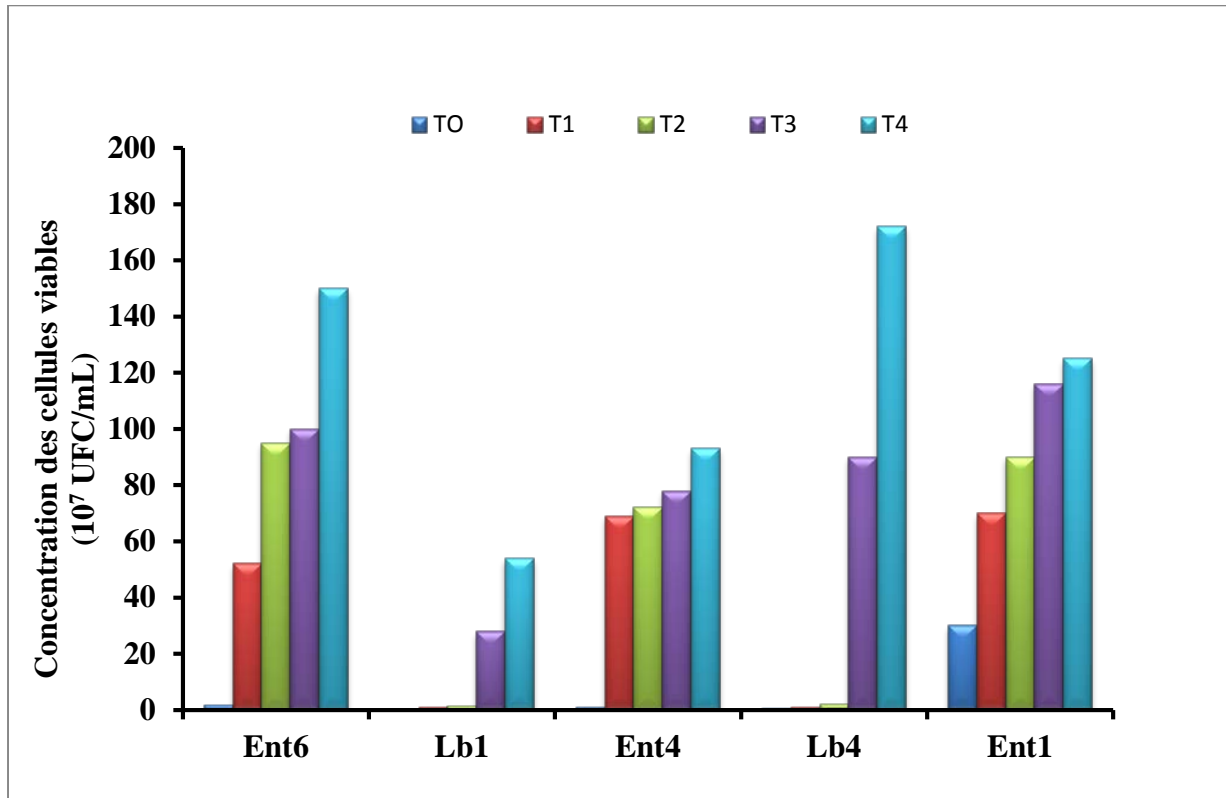


T3



T4

**Figure 7 :** Cinétique de croissance de *Enterococcus spl* pendant 4h d'incubation



**Figure 8:** Cénitique de croissance bactérienne au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par *Enterococcus sp6* (Ent6), *Lactobacillus sp1* (Lb1), *Enterococcus sp4* (Ent4), *Lactobacillus sp4* (Lb4) et *Enterococcus sp 1* (Ent1).

**T0 :** début de la fermentation

**T1 :** 1 heures

**T2 :** 2 heures

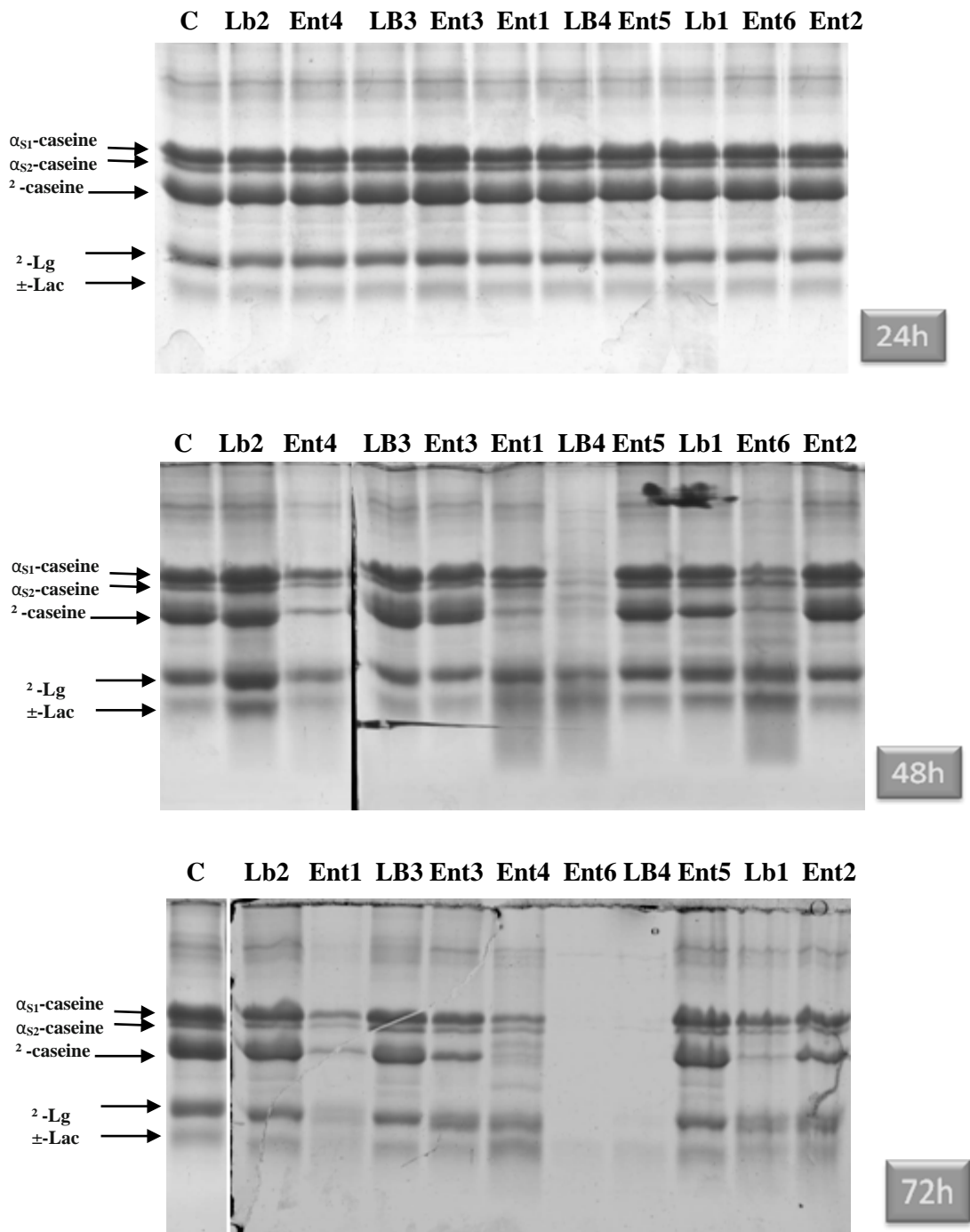
**T3 :** 3 heures

**T4 :** 4 heures

### 3.4 Caractérisation biochimique des laits fermentés

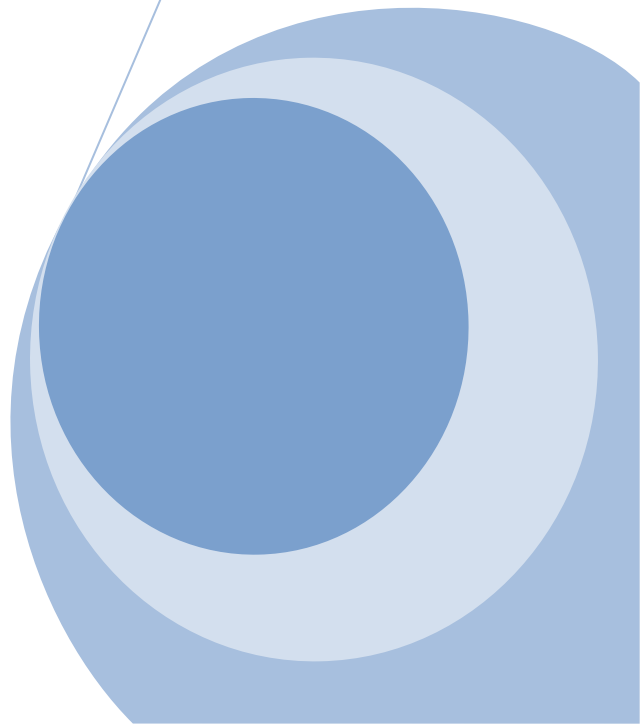
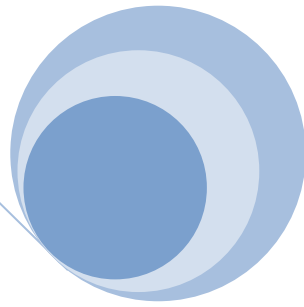
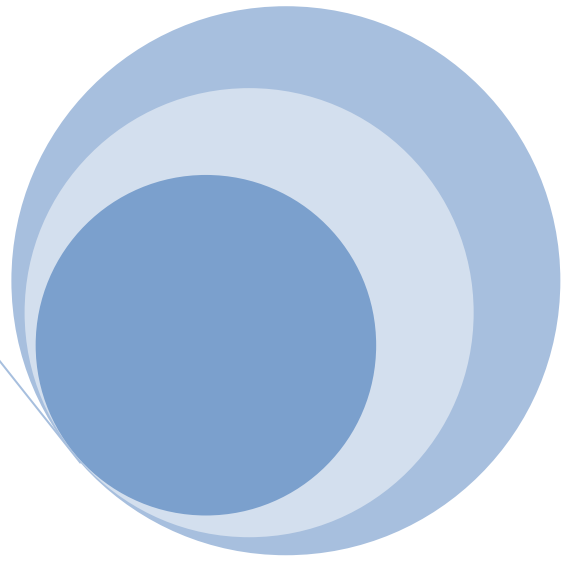
La protéolyse des protéines du lait conduit au changement structural des caséines, de la  $\alpha$ -Lg et de  $\beta$ -Lac qui a pour conséquence la production des peptides matérialisés par l'apparition de nouvelles bandes en électrophorèse SDS PAGE.

L'analyse de l'activité protéolytique des bactéries lactiques testées montre qu'il y avait quelques souches qui hydrolysent toutes les protéines du lait. Après 48 heures de fermentation, nous observons une disparition des bandes correspondant aux protéines du lait ( **figure 9**). Nos résultats sont en accord avec ceux de El - Ghaish et *al.* (2010b) ; Ahmadova et *al.*, (2011) ; Hadji Sfaxi et *al.* (2012) qui montrent une activité protéolytique marquée chez *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* I-N-10.



**Figure 9 :** Electrophorèse SDS-PAGE des hydrolysats issue des bactéries inoculées dans le milieu lait UHT (37°C/24h, 48h et 72h)

Conclusion



## Conclusion

---

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire afin d'exploiter leur pouvoir acidifiant et aromatisant.

Des chercheurs viennent de mettre en évidence un nouveau rôle bénéfique du lait maternel car ce dernier contient des bactéries nécessaires pour l'être humain et surtout pour le les nouveau-nés.

La présente étude a été conduite dans le but de connaître les propriétés technologiques de la population lactiques présente chez le lait maternel. Les échantillons du lait de 10 femmes étaient collectés auprès des différentes polycliniques de la région oranaise ont fait l'objet d'étude.

Dans notre travail et dans le premier temps on a testé 10 souches dont on a sélectionné seulement cinq qui ont présenté un bon profil fermentaire, Les valeurs de pH sont comprises entre 6,5 et 5,9 avec une augmentation de l'acidité entre 20° à 40°D pendant 4h d'incubation à 45°C. La diminution du pH au cours de la fermentation est due à l'action des bactéries lactiques dans le lait.

L'augmentation de l'acidité durant la fermentation est due à la formation de différents acides organiques dont le plus important est l'acide lactique venant de la dégradation des sucres par la flore lactique existante.

Sur le plan de la caractérisation microbiologique, Nous avons enregistré une bonne croissance bactérienne après 4h de fermentation. Nous avons noté une corrélation entre le temps de fermentation et la concentration bactérienne.

Concernant l'analyse de l'activité protéolytique des bactéries lactiques testées on a démontré qu'il y avait seulement deux souches qui hydrolysent toutes les protéines du lait. Après 72 heures de fermentation.

Les résultats obtenus permettront de concevoir des stratégies de nutrition infantile pour améliorer la santé des nourrissons. Ils affirment que « si les bactéries du lait maternel découvertes pendant ces étude s'avéraient importantes pour le développement du système immunitaire, les ajouter aux laits artificiels pourrait être une stratégie pour diminuer le risque d'allergies, d'asthme et de maladies auto-immunes. »

Des alternatives peuvent être proposées pour continuer ce travail :

- Augmenter le temps d'incubation de 4h à 24h et tester le pouvoir acidifiant.
- Tester l'activité antimicrobiennes de ces souches contre les pathogène.
- La sélection des souches ayant un pouvoir acidifiant et activité protéolytique pour une éventuelle utilisation comme ferments ou aditifs dans le lait infantiles.

The image features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. These circles are arranged in a triangular pattern, with two smaller circles at the top and a larger one at the bottom. Thin blue lines extend from the top-left and top-right corners towards the center, framing the circles. The text 'Références bibliographiques' is positioned in the lower-left quadrant of the page.

Références  
bibliographiques

- **Ahmadova A, Dimov S, Ivanova I, Choiset Y, Chobert J.-M, Kuliev A et Haertlé T.(2011).**Proteolytic activities and safety of use of *Enterococci* strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *Eur. Food. Res. Technol.*,**233**:131–140.
- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrou T R .(2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, **23**: 30-37.
- **Béal C et Sodini I.(2012).**Fabrication des yaourts et des laits fermentés . Techniques de l'Ingénieur f6315. *Paris France.*,16 p.
- **Bekhouche Farida. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.
- **Bélury MA. (1995).** Conjugated dienoic linoleate. a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr Rev.*, **53**: 83-9.
- **Belyagoubil.(2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. *Thèse de Doctorat en Biologie. Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen.* 170p.
- **Bergy's Manual.(2009).**Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the fermicutes. Edition springer.,**3**:119-169.
- **Block S.S.( 1991).** Peroxygen compound. In: disinfection, sterilization and preservation. *ed. Lea and Feabiger, Philadelphia.*, 169-180.
- **Booth J.R. (1985).** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews.*,**49**: 359-364.

- **Bouton Y, Guyot P, Dasen A et Grappin R.(1993).** Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. *Lait.*, **73** : 265-279.
- **Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A. and Sarullo V.(2003).** Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal.*,**13**: 191-200.
- **Casalta E., Vassal Y., Desmazeaud M.J. and Casabianca F. (1995).** Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technology* **28**: 291- 299.
- **Chavarrie.J., Nunez J.A. and Nunez M.(1983).** Behavior of *Streptococcus lactis* in heat treated (80 °C for 30 min) or sterilized cow's or ewe's milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 357-363. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technology.*,**28**: 291- 299.
- **Chekroun A, Bensoltane A, Kheroua O et Saidi D.(2001).** Dietetic valorisation of cow's milk proteins fermented at 45°C by *Lactobacillus acidophilus* associated with *Bifidobacteria*. *J. Agric. Sci. Technol.*, **5**(3):282–289.
- **F.Chougrani,A.M.A.,Cherigen,A.Bekada,M.EL soda and A.Bensoltane(2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. *African J. Biotech.*,**6**(15):1.
- **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage.*,**1** : 25-116.
- **De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. *Uriage, Lorica, France.*, **1** : 1-286.
- **De Roissart H.B. (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. *Paris*, 343-407.
- **Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures.*,**5**: 331-343.
- **Dib H, Hajj Semaan E, Mrad R, Ayoub J, Choueiry L, Moussa H et Bitar G.(2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Leban. Sci J.*, **13** (1):43–48.

- **Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. and Shaha N.P.(2007).** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences.*, **86**: 21-38.
- **Dortu C. et Thonart P.(2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.*,**13**(1) : 143-154.
- **Dr. med. Christopher Mayr(2013).** Bactéries dans le lait maternel : le microbiome du lait maternel : « compacte recherche sur le lait maternel : information et actualité » Ed. Milupa GmbH, Bahnstraße,14–30.
- **Eklund T.(1984).** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology.*, **4**: 179-185.
- **El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T et Chobert J-M.(2010).**Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *Eur. Food Res. Technol.*,**230**: 635–643.
- **Farkyen.Y., Madkor S.A. and Atkins H.G. (1995).** Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *Int Dairy J.*,**5**: 715-725.
- **Galvez A., Abriouel H., Ben Omar N. and Lucas R.(2011).** Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain.,253-390.
- **Ghodduzi HB, Robinson RK (1996)** The test of time. *Dairy Indust Int.*, **61**:25–28.
- **Gomes A.M.P. and Xavier Malcata F.(1998).** Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis *via* technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, **81**: 1507-1992.
- **Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S.(2000).** Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr.*, **130** : 3014-20.
- **Guiraud, Joseph-Pierre.(2003).** Microbiologie alimentaire,ed Dunod, Paris,651p.

- **Hadji Sfaxi I, El-Ghaish S, Ahmadova A, Rabesona H, Haertlé T et Chobert JM.(2012).**Characterization of new strain *Lactobacillus paracasei* I-N-10 with proteolytic activity: Potential role in decrease in b-casein immuno-reactivity. *Eur. Food Res. Technol.*, **235**: 447–455.
- **Heird WC.(2000).** The role of polyunsaturated fatty acids in term and preterm infants and feeding mother. *Pediatr Clin North Am.*,**48** : 173-88.
- **Heller K.J. (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition.*, **73**: 374S-379S.
- **Hogg T. (2005).** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.
- **Hamosh M.( 2000).**Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am* 2000., **48** : 69-86.
- **Jeanson S. (2000).** La maturation du lait dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite : le rôle des *lactocoques*. *Thèse de doctorat*. Université de Dijon, France. 243p.
- **J. P. Accolas, R. Bloquel, R. Didiene, J. Regnier.(1977).** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Le Lait*, INRA Editions.,**57** (561 562).1-23.
- **Jia HP, Starner T, Ackermann M et al.(2001) .** Abundant human  $\alpha$ -defensin 1 expression in milk and mammary gland epithelium. *J Pediatr.*,**138** : 109-12.
- **Khan S.H. and Ansari F.A. (2007).** Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **20**(1): 76-82.
- **Klaenhammer T.R., Azcarate-Peril M.A., Altermann E. and Barrangou R. (2007).** The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics.*,**137**: 748S- 750S.
- **Kling PJ.(2002).** Roles of erythropoietin in human milk. *Acta Paediatr.*, **438**: 31-5.
- **Konig H. and Frohlich J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*,**1**:3-29.
- **Kunz C, Rudloff S, Baier W et al.(2000).** Oligosaccharides in human milk : structural, functional and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr*; **20** : 699-722.

- **Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger.(1970).** E., *J. Mol. Biol.*, **49**: 99.
- **Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A. and Delacroix-Buchet A. (2004).** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology.*,**70**: 5644-5650.
- **Lane C.N. and Fox P.F. (1996).** Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal.*, **7**: 715-728.
- **Larpent J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier.* Paris., **8**: 10-72.
- **Law J. and Haandrikman A. (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, **7**: 1-11.
- **Luquet F.M. et Corrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. *Santé et Nutrition.* France.,**36**:376-376.
- **Lynch C.M., Mc Sweeney P.L.H., Fox P.F., Cogan T.M. and Drinan F.D. (1997).** Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait.*,**77** : 441-459.
- **Makhloufi K.M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. *Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie.* Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.
- **Mayra-Makinen A. and Bigret M.(2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 73-102.
- **M. Tackoen .( 2012) .** Breast milk : its nutritional composition and functional Properties *.Rev Med Brux .* Centre Néonatal, C.H.U. Saint-Pierre . **33** : 309-17.
- **Monnet V., Latrille E., Beal C. et Corrieu G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris: 512-592.

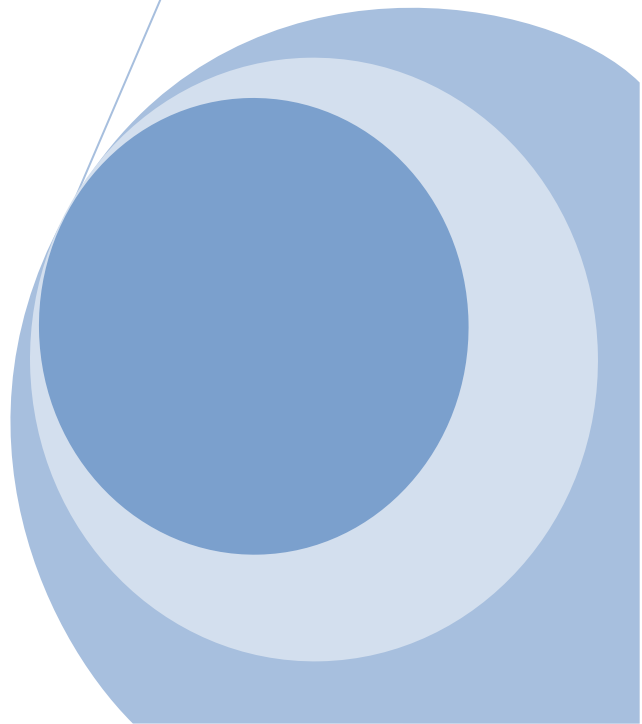
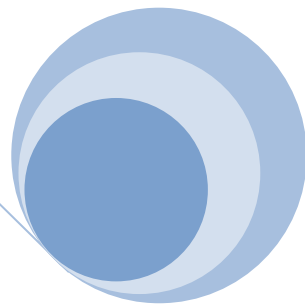
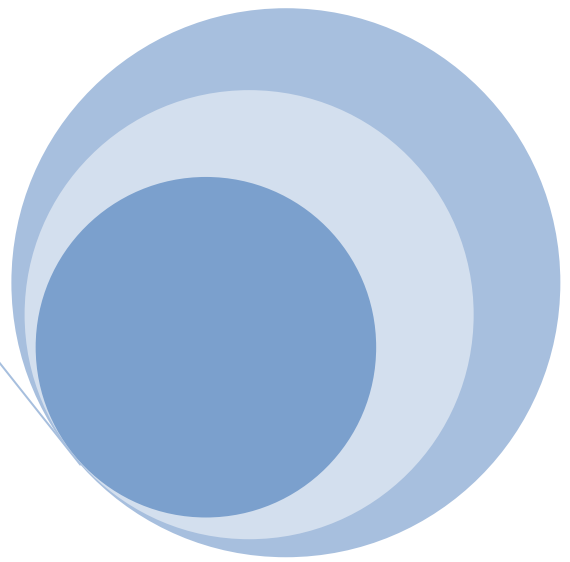
- **Nayra S., Sharaf O.M., Ibrahim G.A. and Tawfik N.F. (2002).** Incorporation and viability of some probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **30**: 217-229.
- **Oliveira M.N., Sodini I., Remeuf F. and Corrieu G. (2001).** Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, **11**: 935-942.
- **Owen CG, Whincup PH, Odoki K et al.(2002).** Infant feeding and blood cholesterol : a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics.*,**110** : 597-608.
- **Pereira de Souza AH, Nobre Costa GA, da Silva Miglioranza LH, Furlaneto-Maia L et Flavia de Oliveira A.(2013).** Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum. Health Sci.*, **35**(1):125–131.
- **Pringsulaka O., Thongam N., Suwannasai N., Atthakor W.Pothivejkul K. and Rangsiruji A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, **23**: 547-551.
- **Raul Cabrera-Rubio, M Carmen Collado, Kirsi Laitinen, Seppo Salminen, Erika Isolauri, and Alex Mira.(2012).** The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery., *Am J Clin Nutr.*,**96**:544–51.
- **Reynolds A. (2000).** Breast-feeding and brain development. *Pediatr Clin North Am.*, **48** : 159-72.
- **Ross.P. R ; Morgan, S. et Hill, C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.*, **79**: 3 – 16.
- **Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J.Sci. Res.*, **34** (2): 218-227.
- **Salle BL.(1993).** Le lait de femme. In : *Traité de nutrition pédiatrique*. Ricour C, Ghisolfi J, Putet G, Goulet O. (ed.). Paris : éditions Maloine., 973-400.
- **Salminen S., Wright A.V. and Ouwehand A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc.*, U.S.A., **79**: 3 – 16.

## Références bibliographiques

---

- **Soomro A.H., Masud T. and Anwaar K. (2002).** Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1**(1): 20-24.
- **Stadhouders.J.(1986)** . The human milk microbiome; *Netherlands milk and dairy journal.*,**7**:40.155.
- **Uehara S., Monden K., Nomoto K., Seno Y., Kariyama R. and Kumon H. (2006).** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **28**: 30-34.
- <http://www.futura-sciences.com/sante/actualites/medecine-lait-maternel-source-bacteries-bienfaitrices-48511>

# Annexe



## Annexe

### ❖ Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (De Man et al., 1960)

Peptone	10 .0g/l
Extrait de viande	10.0g/l
Extrait de levure	5.0g/l
Glucose	20.0g/l
Tween 80	1.0g/l
Phosphate di-potassique	2.0g/l
Acétate de sodium 3H <sub>2</sub> O	5 .0g/l
Citrate d'ammonium	2.0g/l
Sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0.2g/l
Sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0.05g/l
Eau distillée	1000 ml
pH	6.5

### ❖ Technique de coloration de Gram

#### Préparation d'un frottis à partir d'une culture solide

1. Identifier la lame en y inscrivant le nom de la bactérie
2. Déposer une gouttelette d'eau sur la lame
3. Flamber l'anse de platine jusqu'à ce qu'elle devienne rouge
4. Trouver une colonie isolée sur la gélose
5. Toucher à cette colonie avec l'anse de repiquage
6. Emulsionner les bactéries prélevées dans la gouttelette d'eau
7. Flamber l'anse de repiquage jusqu'à devienne rouge
8. Fixer le frottis à la chaleur

### ❖ Procédure de la coloration de Gram

1. Déposer les lames sur le support au-dessus de lévier.
2. Couvrir les lames avec du violet de gentiane. Laisser agir une minute. Rincer à l'eau.
3. Couvrir les lames avec du lugol et laisser agir une minute. Rincer à l'eau.
4. Ajouter l'alcool goutte à goutte pendant quelque secondes.
5. Couvrir les lames avec la fuchsine. Laisser agir 60 secondes. Rincer à l'eau.

## Annexe

---

❖ **Tableau 5** : Composition des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE 12%)

<b>Solution</b>	<b>Gel de concentration</b>	<b>Gel de séparation</b>
<b>Acrylamide 40%</b>	0,2 ml	1,8 ml
<b>Tris 2M pH 8,8</b>		1 ml
<b>Tris 0,5M pH 6,8</b>	0,3ml	
<b>Eau</b>	2 ml	3,2 ml
<b>SDS 10%</b>	25 $\mu$ l	60 $\mu$ l
<b>APS 10%</b>	20 $\mu$ l	60 $\mu$ l
<b>Temed</b>	4 $\mu$ l	12 $\mu$ l