

Département de Biologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

Thème:

**Études phénotypiques et génotypiques des
bactéries lactiques isolées du lait de vache cru**

Présenté par :

* Belarbi Aya Noudjoud

* Djeled Ryma

Devant le jury composé de :

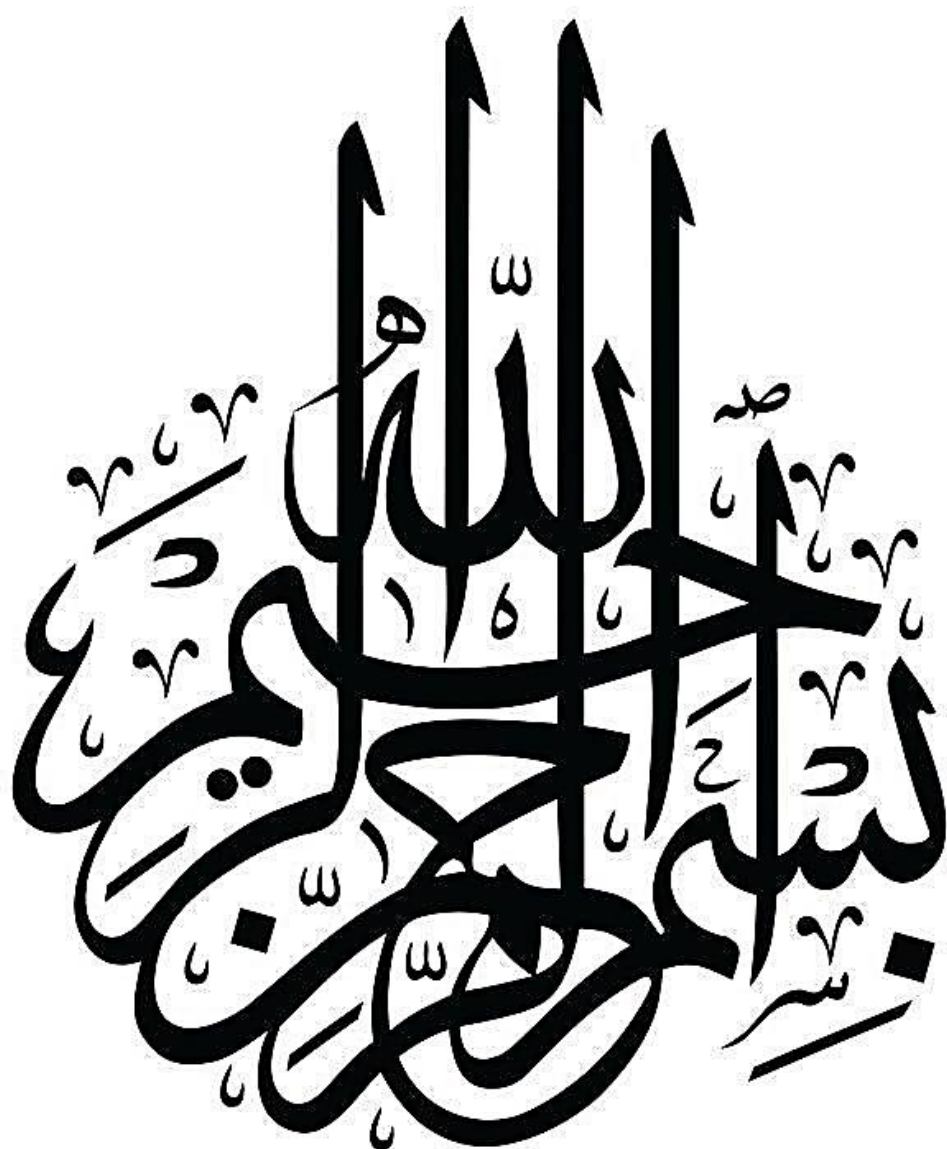
*Examinatrice	Mme BAHLOUL H.	Dr U. Mostaganem
*Présidente	Mme CHOUGRANI F.	Pr U. Mostaganem
*Encadrante	Mme MENAD N.	Pr U. Mostaganem

Année universitaire : 2025/2026

Laboratoire de microbiologie N°2, faculté SNV, université de Mostaganem

Laboratoire de technologie alimentaire et nutrition, faculté SNV, université de Mostaganem

Laboratoire NASIM, Constantine



Remerciements



♥ « Avant tout, nous remercions Dieu le Tout-Puissant de nous avoir donné la force, la Patience, le courage et la santé pour accomplir ce modeste travail. »

♥ Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre estimable encadrante **Mme MENAD N.** pour son orientation précieuse, sa patience, ses conseils judicieux et son soutien constant tout au long de la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de notre grand respect et de notre haute considération.

profonds remerciements vont également aux membres du jury : **Mme CHOUGRANI F.** et **Mme BAHLOUL H.** qui ont accepté d'évaluer et d'enrichir ce travail par leurs remarques constructives. ♥ Nous adressons également un remerciement particulier à **Mr DAHOU A.A.** pour son aide précieuse et son soutien durant la réalisation de ce travail

♥ Enfin, nous dédions ce travail avec un immense amour à nos chères familles : à nos parents pour leurs sacrifices, leurs prières quotidiennes et leur soutien inconditionnel, ainsi qu'à nos frères et amis qui nous ont toujours encouragés de près ou de loin.

♥ *Merci à tous ceux qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réussite de ce parcours universitaire.*



Graduation 2026

2026

فَأَجْمِرُوا عَيْنَكُمْ فِي الْحِجَابِ وَاجْلِسُوا فِي الْحِجَابِ

DÉDICACE

♥ À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma gratitude pour vos sacrifices, votre soutien et vos prières. Grâce à vous, j'ai appris que tout rêve mérite d'être vécu.

Que Dieu vous garde et vous accorde santé et bonheur.

À MON CHER GRAND-PÈRE, QUE DIEU L'ACCUEILLE DANS SON VASTE PARADIS

Tu n'es plus là, mais ton amour et tes prières m'accompagnent chaque jour. Ce succès est aussi le tien. Puisse Allah t'accorder Sa miséricorde éternelle.

♥ À mes chers frères

Pour votre amour, vos encouragements et votre présence dans tous les moments de ma vie. Vous êtes ma force et ma fierté.

À MES PRÉCIEUX AMIS

Merci pour tous les rires, les souvenirs, les nuits blanches, le soutien et la motivation. Vous avez rendu ce parcours plus beau et inoubliable.

♥ À mon binôme

À ma partenaire de travail, de stress, de doute et de réussite. Merci pour ta confiance, ta patience et ton engagement à mes côtés. Cette réussite est aussi la nôtre.

♥ À moi-même

Pour ma persévérance, ma détermination, mes sacrifices et toutes ces fois où je me suis relevée. Je suis fière du chemin parcouru et de la personne que je suis devenue.

♥ À mes chers enseignants

Pour leur savoir, leurs précieux conseils, leur patience et leur accompagnement tout au long de mes études.

Merci pour tout. ♥

Graduation 2026



2026

فأجملو عني من هذا الحارة وحل في حياتي

DÉDICACE

Au nom d'ALLAH

clément et miséricordieux

JE DÉDIE CE

MODESTE TRAVAIL :

♥ **À l'homme de ma vie, mon exemple éternel**, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à mon cher père « **Bouabdallah** ».

♥ **À ma chère maman « Zineb »**, pour son amour infini, sa tendresse, ses sacrifices et ses prières quotidiennes qui ont éclairé mon chemin vers le succès.

♥ **À mes chers frères**, pour leur soutien inconditionnel, leur présence chaleureuse et leurs précieux encouragements tout au long de mon parcours.

♥ **À mes précieux petits chéris**, mon cher neveu « **Sanad** » et ma chère nièce « **Soudjoud** », que Dieu les protège, les bénisse et leur accorde une vie pleine de joie et de réussite.

♥ **À ma tendre amie**, ma confidente et la compagne de ma vie « **Hafsa** », en témoignage d'une amitié sincère et de moments inoubliables.
compréhension, son soutien indéfectible et son partage durant toutes les étapes de ce travail.

♥ **Sans oublier mon cher et formidable binôme « Noudjoud »**
pour sa patience, sa précieuse



Résumé

Le lait cru de vache constitue un écosystème complexe et un réservoir naturel de bactéries lactiques autochtones présentant un intérêt majeur pour l'industrie agroalimentaire et la biotechnologie. L'objectif principal de cette étude est d'isoler, de caractériser sur le plan phénotypique et d'identifier par des approches moléculaires la flore lactique locale issue du lait de vache cru prélevé dans la région de Mazagran (Mostaganem, Algérie). L'évaluation des paramètres physico-chimiques du lait prélevé a révélé une excellente qualité sanitaire et une fraîcheur optimale, avec un pH compris entre 6,5 et 6,7. L'isolement sur milieu sélectif MRS a permis de sélectionner six souches représentatives (S1 à S6), toutes caractérisées comme des bactéries à Gram positif et catalase négatives. La caractérisation phénotypique approfondie (morphologie, tests physiologiques de tolérance à la température, au pH et au NaCl, ainsi que le profil fermentaire des sucres) a permis d'orienter les isolats de forme coccoïde (S1 à S4) vers le genre *Enterococcus* (*E. faecium* et *E. faecalis*), tandis que les isolats bacillaires (S5 et S6) ont été rattachés au groupe des lactobacilles. Afin de confirmer et d'affiner l'identification taxonomique à l'échelle génomique, la technique de fingerprinting par (GTG)₅-PCR a été appliquée. L'analyse des profils électrophorétiques et du dendrogramme a permis d'identifier avec certitude l'isolat G7 comme *Lactiplantibacillus plantarum* (souche de référence ATCC 8014) et les isolats G1, G2 et G5 comme *Limosilactobacillus fermentum* (souche de référence ATCC 9338). La forte similarité génétique observée entre G1, G2 et G5 suggère une origine écologique commune. En conclusion, ces travaux mettent en évidence l'efficacité de la combinaison des approches phénotypiques et génotypiques pour l'exploration de la biodiversité microbienne locale et la valorisation du potentiel biotechnologique des bactéries lactiques autochtones.

Mots-clés : Lait cru de vache, bactéries lactiques, caractérisation phénotypique, (GTG)₅-PCR, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*.

Abstract

Raw cow's milk represents a complex ecosystem and a rich natural reservoir of autochthonous lactic acid bacteria with significant potential for food biotechnology. The primary objective of this study was to isolate, phenotypically characterize, and genotypically identify the indigenous lactic flora from raw cow's milk collected in the Mazagran region (Mostaganem, Algeria). Physico-chemical analyses of the collected milk samples confirmed high hygienic quality and freshness, with pH values ranging from 6.5 to 6.7. Isolation on MRS medium led to the selection of six representative strains (S1 to S6), all of which were Gram-positive and catalase-negative. Comprehensive phenotypic characterization including cell morphology, physiological tolerance to temperature, pH, and NaCl, alongside carbohydrate fermentation profiling allowed the assignment of coccoid isolates (S1 to S4) to the genus *Enterococcus* (*E. faecium* and *E. faecalis*), whereas rod-shaped isolates (S5 and S6) were linked to the lactobacilli group. To refine and achieve definitive taxonomic identification at the genomic level, molecular fingerprinting using (GTG)₅-PCR was performed. Electrophoretic pattern analysis and dendrogram clustering successfully identified isolate G7 as *Lactiplantibacillus plantarum* (ATCC 8014 reference strain) and isolates G1, G2, and G5 as *Limosilactobacillus fermentum* (ATCC 9338 reference strain). The high genetic similarity among G1, G2, and G5 indicates a shared ecological origin. Overall, this study demonstrates the complementarity of phenotypic and molecular methods in evaluating raw milk microbial diversity and highlights the technological value of local lactic acid strains.

Keywords: Raw cow's milk, lactic acid bacteria, phenotypic characterization, (GTG)₅-PCR, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*.

المخلص

يُشكل حليب البقر الخام نظامًا بيئيًا معقدًا وخزانًا طبيعيًا غنيًا ببكتيريا حمض اللاكتيك المستوطنة ذات الأهمية البالغة في مجالات البيوتكنولوجيا والصناعات الغذائية. تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف النبيت الميكروبي اللبني المحلي مظهريًا وتحديد جينيًا من عينات من حليب البقر الخام المأخوذ من منطقة (مزرعان) ولاية مستغانم، الجزائر

أظهرت التحاليل الفيزيوكيميائية للحليب جودة صحية ممتازة وطزاجة عالية، حيث تراوحت درجات الحموضة (pH) بين 6.5 و 6.7. مكنت عملية العزل على وسط MRS من اختيار ست سلالات ممثلة (من S1 إلى S6)، أظهرت جميعها تفاعلًا موجبًا لصبغة غرام وسلبًا لاختبار الكاتالاز. وقد أتاح التوصيف المظهري الشامل (الشكل المورفولوجي، القدرة على تحمل درجات الحرارة مختلفة، درجات الحموضة، تركيزات NaCl، إضافة إلى النمط التخميري للسكريات (تصنيف العزلات الكروية S1 إلى S4 ضمن جنس *Enterococcus* النوعين *E. faecium* و *E. faecalis*)، بينما صُنفت العزلات العصوية (S5 و S6) ضمن مجموعة العصيات اللبنية (*Lactobacillus*).

ولزيادة دقة التحديد الجيني على المستوى الجزيئي، تم تطبيق تقنية البصمة الوراثية. (GTG)_s-PCR وأتاح تحليل أنماط الرحلان الكهربائي والمخطط الشجري (Dendrogram) تحديد هوية العزلة G7 بدقة على أنها *Lactiplantibacillus plantarum* (السلالة المرجعية ATCC 8014)، والعزلات G1 و G2 و G5 على أنها *Limosilactobacillus fermentum* (السلالة المرجعية ATCC 9338) كما يُشير التشابه الجيني المرتفع بين G1 و G2 و G5 إلى وجود أصل بيئي مشترك. ختامًا، تؤكد هذه النتائج تكامل المناهج المظهرية والجزيئية في استكشاف التنوع البيولوجي الميكروبي للحليب الخام، وتبرز الإمكانيات البيوتكنولوجية الواعدة للبكتيريا اللبنية المحلية .

الكلمات المفتاحية: حليب البقر الخام، بكتيريا حمض اللاكتيك، التوصيف المظهري، (GTG)_s-PCR،
Limosilactobacillus fermentum، *Lactiplantibacillus plantarum*، *Lactobacillus* sp.، *Enterococcus* sp.

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection

BAL (ou BL) : Bactéries lactiques

BCP : Bromocrésol pourpre

BLAST : Basic local alignment search tool

Bp : Paires de bases (base pairs)

Kb : Kilopaire de bases

MRS : de Man, Rogosa and Sharpe (milieu de culture)

NaCl : Chlorure de sodium

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

pH : Potentiel hydrogène

TBE : Tris-Borate-EDTA (Tampon d'électrophorèse)

v/v : Volume par volume

VP : Voges-Proskauer

w/v : Poids par volume

(GTG)₅-PCR : REP-PCR basée sur les amorces (GTG)

Liste des tableaux

Le tableau	Page
Tableau 01 : Flore indigène du lait cru	9
Tableau 02 : Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	20
Tableau 03 : Paramètre du protocole de prélèvement, de conservation et de transport des échantillons de lait	26
Tableau 04 : Séquences des amorces spécifiques utilisées en PCR	37
Tableau 5 : Les souches de références ATCC utilisées	37
Tableau 06 : Caractéristiques moléculaires et amorces de PCR des souches de référence ATCC	37
Tableau 07 : Description morphologique et macroscopique des isolats bactériens	39
Tableau 08 : Comparaison du profil de croissance des isolats en fonction de la température	43
Tableau 09 : Type fermentaire et production de l'acétoïne	44
Tableau 10 : Profil fermentaire des souches isolées	45
Tableau 11 : Récapitulatif de l'identification phénotypique des souches isolées	46
Tableau 12 : Résultats de l'identification des produits de la PCR (profils GTG5-PCR) du 22 au 27 Août 2026	49

Liste des figures

La figure	Page
Figure 01 : composition du lait de vache g/L	3
Figure 02 : valeurs en vitamines liposolubles dans le lait de vache µg/100ml	6
Figure 03 : schéma complet du dénombrement et de l'isolement de bactéries lactiques à partir du lait de vache cru	26
Figure 04 : étapes de la coloration de Gram et observation microscopique des bactéries	27
Figure 05 : test de catalase montrant une réaction positive et négative	28
Figure 06 : aspect microscopique après coloration de Gram (Gx100) de bactéries isolées	40
Figure 07 : la croissance à différents pH	41
Figure 08 : la croissance à différentes températures des isolats	42
Figure 09 : test de type fermentaire	42
Figure 10 : la fermentation des sucres par la souche S1, S3	45
Figure 11 : gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)5-PCR des isolats de bactéries lactiques testées	47
Figure 12 : gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)5-PCR des isolats de bactéries lactiques testées	48
Figure 13 : analyse d'inter-similarité génomique par rep-PCR (GTG) ₅ d'isolats de bactéries lactiques sauvages et de leurs homologues de référence	49
Figure 14 : dendrogramme de classification hiérarchique des isolats de bactéries lactiques basé sur le profil de corrélation de Pearson.	54

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé / Abstract / الملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.1. Définition du lait	3
I.2. Définition du lait de vache	3
I.3. La composition nutritionnelle du lait	3
I.3.1. L'eau	4
I.3.2. Les protéines	4
I.3.3. Les lipides.....	4
I.3.4. Les glucides	5
I.3.5. Matière minérale	5
I.3.6. Vitamines	6
I.3.7. Enzymes.....	6
I.4. Les caractéristiques du lait de vache	7
I.4.1. Caractéristiques organoleptiques.....	7
I.4.1.1. La couleur	7
I.4.1.2. Odeur	7
I.4.1.3. Saveur	7
I.4.1.4. Viscosité	8
I.4.2. Caractéristiques physico-chimiques	8
I.4.2.1. pH	8
I.4.2.2. Acidité	8
I.4.2.3. La densité	9
I.4.2.4. La viscosité	9
I.5. La flore originelle	9
I.5.1. Bactéries productrices des toxines	10
I.5.2. Facteurs favorisant la production	10
I.5.2.1. Température	11
I.5.2.2. pH	11
I.5.3. La flore du lait de vache	11
I.5.3.1. Flore d'altération	12
I.5.3.2. Les coliformes	12
I.5.3.3. Pseudomonas	12
I.5.3.4. La flore de contamination	12
I.5.3.5. La flore pathogène	13
I.5.3.6. Bactéries infectieuses	13

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

II.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	13
II.2. Définition des bactéries lactiques.....	13
II.3. Habitat des bactéries lactiques	14

II.4. Caractéristiques générales des BL	15
II.4.1. Morphologiques et cytologiques	15
II.4.2. Physiologiques et thermiques	15
II.4.3. Biochimiques et nutritionnelles	15
II.5. Classification des bactéries lactiques	16
II.5.1. <i>Streptococcus</i>	16
II.5.2. <i>Lactobacillus</i>	16
II.5.3. <i>Lactococcus</i>	17
II.5.4. <i>Leuconostoc</i>	17
II.5.5. <i>Pediococcus</i>	17
II.6. Exigences nutritionnelles des BL	18
Les glucides	18
Les acides aminés	18
L'azote.....	18
Les vitamines	19
Les minéraux	19
L'oxygène	19
II.7. Voies fermentaires des bactéries	20
II.8. Métabolites et antimicrobiens	20
Les acides organiques	20
Le peroxyde d'hydrogène.....	21
Le dioxyde de carbone	21
Le diacétyle	21
Les bactériocines	21
II.9. Propriétés technologiques des BL	22
II.10. Utilisation des bactéries lactiques	23
Comme ferments lactiques	23
Dans la bio-préservation	23
Comme probiotiques	23
II.11. Identification et caractérisation	23
II.11.1. Identification phénotypique	23
II.11.2. Identification génotypique	23

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.1. Objectif du travail.....	24
III.2. Lieu et période de l'étude	24
III.3. Matériel biologique	24
III.3.1. Origine des échantillons	25
III.3.2. Lait de vache cru	25
III.3.3. Souches bactériennes	25
III.4. Échantillonnage et prélèvement	25
III.4.1. Conditions de prélèvement.....	25
III.4.2. Conservation et transport	25
III.5. Isolement et purification	26
III.5.1. Préparation des échantillons	26
III.5.2. Ensemencement sur MRS	26
III.5.3. Isolement des colonies	26
III.5.4. Purification et conservation	26
III.6. Caractérisation des souches	27

III.6.1. Étude morphologique	27
III.6.2. Tests physiologiques	28
III.6.3. Test de la catalase	28
III.6.4. Croissance selon température	29
III.6.5. Croissance selon pH	29
III.6.6. Croissance en NaCl	30
III.6.7. Test de thermorésistance	30
III.6.8. Production d'acétoïne (VP)	31
III.6.9. Type fermentaire	31
III.6.10. Fermentation des sucres	32
III.7. Technique de conservation	32
III.7.1. Conservation à court terme	32
III.7.2. Conservation à long terme	32
III.8. Préparation pour génotypage	33
III.8.1. Identification génotypique	33
III.8.2. Extraction de l'ADN	34
III.8.3. Dosage et pureté de l'ADN	35
III.8.4. Amplification (GTG) ₅ -PCR	36
III.8.5. Électrophorèse sur gel	36
III.8.6. Visualisation des profils	37
III.8.7. Comparaison souches ATCC	37
III.8.8. Construction du dendrogramme	37

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.1. Résultats.....	38
IV.2. Caractérisation du lait utilisé	38
IV.2.1. Caractérisation macroscopique	38
IV.2.2. Caractérisation microscopique	39
IV.2.2.1. Coloration de Gram	40
IV.2.2.2. Test de catalase	40
IV.2.2.3. Croissance selon pH	40
IV.2.2.4. Croissance selon température	42
IV.2.2.5. Thermorésistance	43
IV.2.2.6. Tolérance au NaCl	44
IV.2.2.7. Test Voges-Proskauer	44
IV.2.2.8. Type fermentaire	44
IV.2.2.9. Fermentation des sucres	45
IV.3. Identification phénotypique	46
IV.4. Préparation des souche.....	47
IV.4.1. Profils (GTG) ₅ -PCR	48
IV.4.2. Comparaison souches ATCC	49
IV.4.3. Identification génotypique.....	49
IV.4.4. Similarité génétique	50
IV.4.5. Interprétation dendrogramme	51
IV.4.6. Synthèse génotypique	53
IV.6. Discussion.....	56
Conclusion.....	66
Références bibliographiques.....	68
Annexes.....	74

Introduction

Introduction

Le lait cru de vache constitue un écosystème biologique complexe et dynamique, abritant une biodiversité microbienne autochtone où les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle écologique et technologique majeur (**Ammour *et al.*, 2021 ; Mezaini *et al.*, 2024**). Dans les zones d'élevage traditionnel en Algérie, comme la région de Mazagran (wilaya de Mostaganem), ce produit de terroir représente un réservoir naturel précieux de souches lactiques adaptées aux conditions environnementales locales et dotées d'un fort potentiel biotechnologique (**Belarbi *et al.*, 2026**).

Les bactéries lactiques sont largement reconnues pour leur importance capitale dans la transformation et la biopréservation des denrées alimentaires (**Zapašnik *et al.*, 2022 ; Hadji *et al.*, 2023**). Par leur métabolisme fermentaire, elles synthétisent de l'acide lactique ainsi que divers métabolites (bactériocines, acides organiques, peroxyde d'hydrogène), assurant ainsi l'acidification du milieu, l'inhibition des germes altérants et pathogènes, et la structuration des qualités organoleptiques des produits laitiers (**Mokoena, 2021 ; Benmouna *et al.*, 2025**). En outre, plusieurs souches autochtones issues de la flore laitière algérienne présentent des aptitudes fonctionnelles et probiotiques prometteuses pour la santé humaine (**Tenea et Boudebbouze, 2023 ; Belarbi *et al.*, 2026**).

Toutefois, la valorisation de cette microflore locale exige une caractérisation taxonomique rigoureuse (**Tsegaye *et al.*, 2021**). Si la caractérisation phénotypique traditionnelle (morphologie, profil biochimique et tolérances physiologiques au pH, à la température et au NaCl) demeure une étape préliminaire indispensable, elle s'avère parfois limitée pour discriminer précisément les espèces proches (**Benaissa *et al.*, 2022**). C'est pourquoi le couplage des méthodes phénotypiques avec des outils de biologie moléculaire, tels que le fingerprinting génomique par (GTG)₅-PCR, s'impose aujourd'hui comme une

Introduction

approche fiable, rapide et hautement résolutive pour l'identification et l'étude de la diversité génétique des isolats (**Benítez-Cabello *et al.*, 2021 ; Meziani *et al.*, 2024**).

C'est dans cette perspective que s'inscrit la présente étude, dont l'objectif global est d'isoler, de caractériser sur le plan phénotypique et d'identifier par voie génotypique les bactéries lactiques autochtones isolées du lait de vache cru dans la région de Mazagran (Mostaganem). Pour répondre à cette problématique, notre démarche scientifique s'articule autour de trois axes fondamentaux :

L'évaluation de la qualité physico-chimique du lait cru prélevé, afin de s'assurer de sa conformité et de préserver l'intégrité de sa microflore originelle.

L'isolement et la caractérisation phénotypique approfondie des souches, basés sur la morphologie, les tests physiologiques (croissance selon la température, le pH et la salinité) et les profils biochimiques (fermentation des glucides, catalase, test VP, type fermentaire).

L'identification et la discrimination génotypique des isolats d'intérêt au moyen de la technique (GTG)_s-PCR, complétée par une analyse dendrogrammique comparative avec des souches de référence ATCC.

Le présent mémoire est structuré en deux parties principales : une première partie consacrée à la synthèse bibliographique (Chapitres I et II) abordant les généralités sur le lait et la microbiologie des bactéries lactiques, et une seconde partie expérimentale comprenant le matériel et méthodes (Chapitre III) ainsi que la présentation, l'analyse et la discussion des résultats obtenus (Chapitre IV), pour s'achever par une conclusion générale et des perspectives de recherche.

Partie I

Synthèse

bibliographique

Chapitre I

Généralités sur le lait

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.1. Définition du lait

Le lait est un liquide biologique blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, sécrété par les glandes mammaires des femelles de mammifères. C'est une émulsion complexe de matière grasse dans une solution aqueuse qui contient des protéines, du lactose, des sels minéraux et des vitamines (**Adrian *et al.*, 1988**).

I.2. Définition du lait de vache

Le lait de vache est un mélange complexe constitué d'eau (environ 902g/L) et de matières sèches. Il est défini comme une émulsion de matière grasse dans une phase aqueuse, maintenue par des agents émulsifiants naturels, ainsi qu'une suspension de micelles de caséines et une solution de lactose, de protéines sériques et de minéraux (**Luquet et BonjeanLinczowski, 1997**).

I.3. La composition nutritionnelle du lait

Le lait est considéré comme l'aliment le plus complet de la nature de part sa richesse en nutriments essentiels (figure 1). Sa composition physico-chimique est cependant complexe et reste tributaire de plusieurs facteurs de variation, notamment la race de l'animal, son régime alimentaire ainsi que son stade de lactation (**Amiot, 2002 ; Vignola, 2002**).

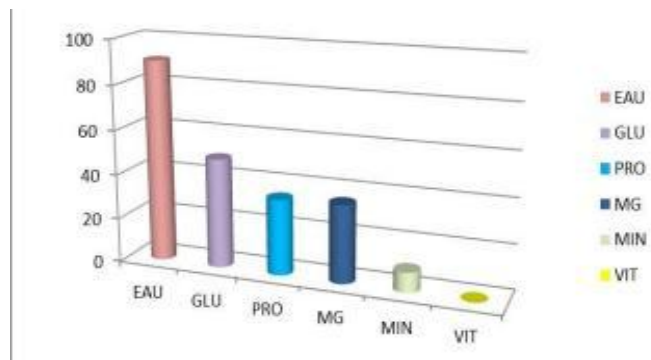


Figure 01 : Composition du lait de vache g/L (Vignola, 2002).

I.3.1. L'eau

L'eau est le constituant quantitativement le plus important du lait de vache, représentant environ 87% à 90% de sa masse totale (soit environ 900 g/L) (figure 1). Son

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

rôle est fondamental car elle sert de phase dispersante (solvant) pour tous les autres composants du lait. On distingue généralement deux formes d'eau dans le lait :

- L'eau libre : qui représente la grande majorité et sert de solvant pour le lactose et les sels minéraux.
- L'eau liée : fixée aux protéines (notamment les caséines) et aux globules gras, elle est indispensable à la stabilité de la structure colloïdale du lait (**Brulé *et al.*, 2012**).

I.3.2. Les protéines

Le lait est composé de 80% de caséine et de 20% de protéines de lactosérum (figure 1). Dans le lait de vache, la caséine alpha s1 est la principale protéine, tandis que le lait de chèvre (GM) contient principalement de la caséine bêta. Le lait de chèvre contient plus de taurine et six acides aminés essentiels (thréonine, isoleucine, lysine, cystine, tyrosine, valine) que le lait de vache, mais moins d'acide folique en raison de la présence d'une protéine liant fortement les folates, ce qui affecte l'absorption de l'acide folique.

Le lait génétiquement modifié est dépourvu de graisses lourdes et de composants produisant du mucus, ce qui en fait une source de protéines complète contenant tous les acides aminés essentiels, et ses fragments de caséine contiennent des peptides antimicrobiens (**Park, 2009**).

I.3.3. Les lipides

Les lipides du lait constituent la principale source d'énergie de ce produit, ils sont faibles en acides gras polyinsaturés (figure 1), qui sont essentiels au métabolisme humain. La digestibilité des lipides du lait est élevée, atteignant 90 à 95%, même chez les enfants présentant une fonction pancréatique réduite. Cela s'explique par plusieurs facteurs, notamment la sécrétion de lipides sous forme de globules par la glande mammaire, où ils sont entourés d'une membrane cytoplasmique contenant des protéines. Les sels biliaires conjugués, tels que le taurocholate ou le taurodéoxycholate, à une concentration physiologique de 1 à 2 mmol/l, permettent de libérer les lipides des globules, facilitant ainsi leur hydrolyse par le système lipase-eolipase et leur absorption. De plus, les lipides du lait se distinguent par la présence d'acides gras à chaîne relativement courte (**Desjeux, 1993**).

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.3.4 Les glucides

Le lait contient des glucides libres, dont le principal est le lactose et des glucides associés aux protéines. La concentration en lactose dans les laits des mammifères est inversement proportionnelle à la teneur en minéraux, avec lesquels il participe à l'équilibre de la pression osmotique. La teneur en lactose du lait varie de 40.8 à 50% (figure 1), et représente 97% des glucides totaux (**Jeantet *et al.*, 2008**).

Le lait renferme aussi d'autres sucres : le glucose, le galactose à raison de quelques dizaines de mg par litre et en quantité tout aussi peu importante des glucides azotés : N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine et acide N-acétylneurominique ou acide sialique (**Mathieu, 1998**).

I.3.5 Matière minérale

La composition minérale du lait est influencée par divers facteurs, notamment la race, le régime alimentaire, le stade de lactation et la santé de la mamelle, tout comme le lait d'autres mammifères. En général, le lait présente des concentrations en minéraux plus élevées que le lait humain. Il est donc particulièrement bénéfique dans les régions où la consommation de viande est faible, grâce à sa richesse en calcium et en phosphate. Le lait contient des niveaux élevés de calcium, de phosphore, de potassium, de magnésium et de chlore, mais moins de sodium et de soufre. Plus précisément, le lait de vache fournit 119 mg de calcium par 100 g, contre 32 mg dans le lait humain (**Turkmen, 2017**).

I.3.6. Vitamines

Des recherches indiquent que le lait de vache contient une concentration plus faible en vitamine A (figure 2) par rapport au lait de chèvre. De plus, le processus de pasteurisation peut également affecter les niveaux de vitamines comme la thiamine, la riboflavine et la vitamine C dans le lait. Il est donc recommandé de diversifier les sources alimentaires afin de garantir un apport adéquat en vitamines et minéraux, surtout si les enfants ne consomment que du lait (**Singh *et al.*, 2021**).

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

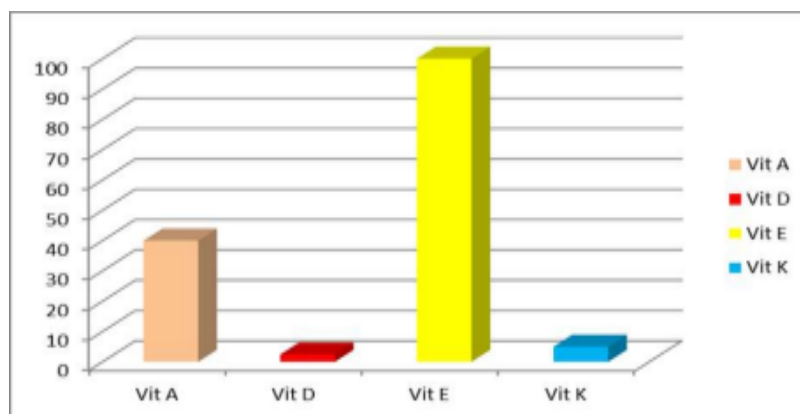


Figure 02 : Valeurs en vitamines liposolubles dans le lait de vache µg/100ml

(Lpointe et Vingnola, 2002)

I.3.7. Enzymes

Le lait, véritable tissu vivant, contient de nombreuses enzymes ; cependant, leur étude est difficile car on ne peut pas toujours facilement séparer les enzymes naturelles du lait de celles qui sont sécrétées par les microbes présents dans le liquide (Veisseyre, 1975).

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases. Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température. En effet, chaque enzyme possède un pH et une température d'activité maximale (Veisseyre, 1975).

Le rôle et l'importance des enzymes dans le lait, peuvent être résumés en trois points essentiels :

- Ce sont des facteurs de dégradation des constituants originels du lait ;
- Certains enzymes jouent un rôle antibactérien et apportent une protection limitée au lait, comme la lactopéroxydase et le lysozyme ;
- Certaines enzymes sont utilisées comme indicateurs de qualité hygiénique (Goursaud, 1985).

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.4. Les caractéristiques du lait de vache

I.4.1. Les caractéristiques organoleptiques

Il s'agit de l'ensemble des propriétés qui caractérisent le lait et que nous percevons par nos sens ; celles-ci comprennent :

I.4.1.1. La couleur

D'après Fredot (2005), le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le B-carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait).

I.4.1.2. Odeur

L'odeur est caractéristique le lait du fait de la matière grasse qui fixe des odeurs animales, elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation et à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette) (Vierling, 2003).

I.4.1.3. Saveur

La saveur du lait normal frais est agréable. Celle du lait acidifié est fraîche et un peu piquante. Les laits chauffés (pasteurisés, bouillis ou stérilisés) ont un goût légèrement différent de celui du lait cru. Les laits de rétention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée. Il en est parfois de même du colostrum.

L'alimentation des vaches laitières à l'aide de certaines plantes de fourrages ensilés, etc. peut transmettre au lait des saveurs anormales en particulier un goût amer. La saveur amère peut aussi apparaître dans le lait par suite de la multiplication de certains germes d'origine extra-mammaire (Thieulin et Vullaume, 1967).

I.4.1.4. Viscosité

L'écémage du lait, qu'il soit spontané (phénomène de montée de la crème) ou artificiel (centrifugation), est sous la dépendance étroite de la viscosité de ce liquide. Les principaux

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

facteurs de variation qui interviennent dans la viscosité du lait c'est : la matière grasse, l'acidité, l' emprésurage et la température (**Tapernoux et Vuillaume, 1934**).

I.4.2. Caractéristiques physico-chimiques

Il s'agit d'une combinaison de deux types de propriétés physiques (ce qu'on peut mesurer sans changer la matière) et chimiques (la composition interne). Elle représente l'identité scientifique du produit.

I.4.2.1. pH

Est compris entre 6.4 et 6.8. C'est la conséquence de la présence de la caséine et des anions phosphorique et citrique principalement. Le pH n'est pas valeur constante (**Amiot *et al.*, 2002**). Il peut varier au cours du cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation. Le colostrum a un pH plus bas du fait de la teneur élevée en protéine (**Gaucher *et al.*, 2008**).

I.4.2.2. Acidité

Selon Abotayeb (**2011**), l'acidité est déterminée à partir d'un équilibre entre les constituants basiques (sodium, potassium, magnésium, calcium et hydrogène) et les constituants acides (phosphates, citrates, chlorures, carbonates, hydroxyles et protéines) du lait. L'acidité est une notion importante pour l'industrie laitière, elle permet de juger l'état de conservation du lait. Elle est exprimée en "degré Dornic" (°D) 1°D=0,1g de l'acide lactique, cette acidité est comprise entre 15°D et 18°D.

I.4.2.3. La densité

La densité est le rapport de la masse volumique avec celle de l'eau, elle est de 1,032 à 20°C pour les laits de grand mélange. Le lait a donc un volume et un poids quasi égaux car sa densité est proche de 1. La densité varie soit en fonction des matières grasses, soit avec la concentration des éléments dissous et en suspension. Un lait écrémé à une densité plus forte, en revanche en cas de mouillage, la densité diminue (**Fredot, 2005**).

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.4.2.4. La viscosité

Elle correspond à la résistance d'un liquide à l'écoulement. Elle est due à la présence de protéines et de matières grasses dans le lait. Elle limite la montée des matières grasses à la surface du lait, diminue lorsque la température augmente et augmente lorsque le pH est < 6 .

I.5. La flore originelle

La définition originale de la flore indigène des produits laitiers désigne l'ensemble des microorganismes présents dans le lait à la sortie du trayon (**Vignola, 2002**). Le lait, collecté dans des conditions optimales chez un animal sain, contient une quantité minimale de microorganismes (moins de 5 000 bactéries/ml et au moins 1 coliforme par millilitre). Il s'agit principalement de bactéries saprophytes présentes dans les canaux de tourbe et de galactophores : microcoques, lactobacilles et lactocoques (tableau 1) (**Hermier et al., 1992; Larpent, 1991**). Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles (**Vignola, 2002**).

Tableau 01 : flore indigène du lait cru (Vignola, 2002)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus</i> sp.	30–90
<i>Lactobacillus</i> sp.	10–30
<i>Streptococcus</i> sp. ou <i>Lactococcus</i> sp.	<10
Bactérie Gram-négative	<10

I.5.1. Bactéries productrices des toxines

La contamination du lait cru par des microorganismes toxigènes représente un risque majeur pour la santé publique. Ces bactéries ne se contentent pas de coloniser le milieu lacté, mais elles peuvent, sous certaines conditions, synthétiser des métabolites secondaires toxiques appelés toxines. Selon Bacha (**2014**), la dangerosité de ces souches réside dans la thermostabilité de certaines de leurs toxines, qui peuvent persister dans le produit fini même après un traitement thermique comme la pasteurisation. Les principales espèces incriminées dans la toxinogénèse laitière sont :

- *Staphylococcus aureus* : c'est la bactérie la plus fréquemment isolée en Algérie dans le lait cru. Elle produit des entérotoxines staphylococciques responsables de graves intoxications

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

alimentaires collectives (TIAC).

- *Bacillus cereus* : une bactérie sporulée ubiquitaire capable de sécréter des toxines diarrhéiques ou émétiques très résistantes.
- *Escherichia coli* (souches STEC) : productrice de Shiga-toxines provoquant des syndromes hémolytiques graves chez le consommateur.

I.5.2. Facteurs favorisant la production de toxines

La production de toxines par les bactéries pathogènes dans le lait n'est pas un phénomène systématique ; elle dépend d'une interaction complexe entre la souche bactérienne et son environnement physico-chimique. Selon Bacha (2014), dans son étude sur la qualité microbiologique du lait en Algérie, ces facteurs déterminent le passage de la simple colonisation à la phase de virulence.

I.5.2.1. Température

La température est le principal levier de la toxinogénèse. Pour les souches comme *Staphylococcus aureus*, très fréquentes dans le lait cru de collecte en Algérie :

- Températures optimales : la synthèse des entérotoxines est maximale entre 35°C et 40°C. À ces températures, le métabolisme bactérien est à son apogée.
- Limites thermiques : en dessous de 10°C, la production est considérablement ralentie. Alais (1984) souligne que le refroidissement rapide du lait après la traite est la barrière la plus efficace contre l'accumulation de métabolites toxiques.
- Thermorésistance : il est crucial de noter que si la bactérie peut être détruite par la chaleur, certaines toxines (comme les entérotoxines staphylococciques) restent stables même après un traitement thermique prolongé.

I.5.2.2. pH

Le pH du milieu influence directement l'activité enzymatique nécessaire à la production de toxines.

- Plage de production : la plupart des toxines sont produites à un pH proche de la neutralité

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

(6.5-7.0), ce qui correspond parfaitement au pH du lait cru fraîchement trait.

- Action inhibitrice de l'acidité : l'acidification naturelle ou dirigée par les bactéries lactiques constitue un facteur d'inhibition majeur. Selon Kihal (1996), lorsque le pH descend sous la barre de 5.0, le métabolisme des pathogènes est perturbé, stoppant ainsi la sécrétion de toxines.

I.5.3. La flore du lait de vache

La présence d'une grande diversité de microorganismes, notamment des bactéries, des levures et autres, dans le lait, grâce à sa riche composition en nutriments essentiels (protéines, sucres et graisses) et à son pH quasi neutre, suggère qu'il constitue un milieu idéal pour la croissance et le développement de la biodiversité microbienne.

I.5.3.1. Flore d'altération

La composante de la flore contaminante, provoque des défauts sensoriels de goût, d'arôme et d'aspect, et réduit la durée de conservation des produits laitiers (Vignola I, 2002). De nombreuses espèces bactériennes présentes dans le lait cru sont capables de dégrader le lactose, les protéines ou les lipides de cette matière première. La flore dominante se compose de trois groupes microbiens : les coliformes (*E. coli* et *Hafnia alvei*), les *Pseudomonas fluorescents* psychrotrophes et les lactobacilles (Jacquer et Veisseyre, 1987).

I.5.3.2. Les coliformes

Les coliformes appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont généralement indicateurs d'une contamination fécale (Petrasxiene et Lapied, 1981). Ces bactéries sont presque toujours présentes dans le lait, mais leur quantité peut être considérablement réduite dans des conditions de production optimales. Elles sont indésirables et, outre la production d'acides et de gaz, génèrent des odeurs désagréables et parfois des substances visqueuses (Alais, 1974).

Cependant, leur présence est un indicateur important de mauvaises conditions d'hygiène pendant ou après la transformation des aliments (Bonney et al., 2002).

CHAPITRE I : Généralités sur le lait

I.5.3.3. *Pseudomonas*

Ce sont des bacilles de 0,5 à 1 µm de diamètre, strictement aérobies, mobiles grâce à des flagelles, mésophiles, positifs pour l'oxydase et la catalase, et ubiquitaires, résistants à la plupart des antibiotiques. Ils sont souvent psychrotrophes et fréquemment responsables de l'altération de divers produits alimentaires. Ces bactéries peuvent être détectées aussi bien dans les matières premières que dans les produits finis (**Larpen, 1997**).

I.5.3.4. La flore de contamination

Elle désigne l'ensemble des microorganismes qui se retrouvent dans le lait depuis sa collecte jusqu'à sa consommation. La flore contaminante, d'altération et pathogène du lait comprend tous les microorganismes introduits dans le lait de vache (**Vignola, 2002**).

I.5.3.5. La flore pathogène

La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut provenir de trois sources: l'animal, l'environnement et l'humain (**Vignola, 2002**).

Parmi les bactéries pathogènes présentes dans le lait cru, certaines espèces sont généralement présentes en très faible concentration et ont peu de chances de proliférer (*Brucella* sp, *Campylobacter fetus* et *Salmonella* sp).

D'autres sont présentes en quantité considérable et, malheureusement, peuvent proliférer ; c'est le cas des bactéries mésophiles telles qu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, ou de l'espèce psychrotrophe *Yersinia enterocolitica* (**Jaquetet, 1987**).

I.5.3.6. Bactéries infectieuses

Certaines bactéries aérobies, comme *B. subtilis*, coagulent le lait sans l'acidifier, tandis que d'autres fermentent le lactose pour produire des boissons thérapeutiques comme le koumys et le kéfire. Certaines bactéries, peu connues, peuvent produire des toxines dans le lait, entraînant des symptômes chez les enfants tels que vomissements et diarrhée. D'autres bactéries altèrent le lait, le rendant filant et visqueux ou amer par fermentation butyrique (**Bennett et al., 2003**).

Chapitre II

Généralités sur les bactéries lactique

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

II.1. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) constituent l'un des piliers fondamentaux de la microbiologie laitière et de la biotechnologie agroalimentaire moderne. Ce groupe de micro-organismes, bien que diversifié sur le plan phylogénétique, est unifié par une caractéristique métabolique centrale : la production d'acide lactique comme produit final principal de la fermentation des glucides.

Historiquement, elles sont reconnues comme les agents de conservation naturels par excellence, ayant permis à l'humanité de stabiliser le lait cru, un produit extrêmement périssable, en le transformant en produits dérivés tels que les laits fermentés et les fromages.

En Algérie, le rôle des bactéries lactiques est d'autant plus crucial qu'elles interviennent dans la production de denrées traditionnelles comme le Raïb et le Lben, dont les qualités organoleptiques et sanitaires dépendent directement de la dynamique de cette microflore. Elles ne se contentent pas de modifier le goût et la texture ; elles créent un écosystème protecteur en abaissant le pH et en sécrétant des substances inhibitrices. Leur étude approfondie permet non seulement de comprendre les processus de fermentation, mais aussi d'isoler des souches autochtones performantes pour une application industrielle standardisée, garantissant ainsi une sécurité alimentaire accrue dans les régions à forte consommation de lait de vache (Guiraud, 2012).

II.2. Définition

D'un point de vue taxonomique et cytologique, les bactéries lactiques sont définies comme des microorganismes procaryotes appartenant au phylum des Firmicutes, principalement regroupés dans la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales. Elles se caractérisent par une réaction positive à la coloration de Gram, ce qui indique une paroi cellulaire riche en peptidoglycane.

Morphologiquement, elles se présentent sous forme de coques sphériques ou de bâtonnets (bacilles), souvent organisés en arrangements spécifiques tels que des paires ou des chaînettes. Sur le plan physiologique, elles sont asporulées, immobiles (pour la grande majorité), catalase-négatives et dépourvues de cytochromes. Bien qu'elles possèdent un métabolisme strictement fermentaire, elles sont qualifiées d'aérotolérantes car elles peuvent croître en présence d'oxygène sans toutefois l'utiliser pour la respiration. Un critère génétique

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

essentiel de leur définition est leur faible teneur en Guanine + Cytosine (G+C%), généralement inférieure à 55 mol, ce qui les distingue d'autres groupes de bactéries à Gram positif. Cette définition rigoureuse permet de les différencier des bactéries d'altération et des pathogènes, tout en soulignant leur adaptation évolutive à des milieux riches en nutriments organiques où la fermentation est la voie privilégiée de production d'énergie (ATP) (**Badis, 2004**).

II.3. Habitat

L'habitat des bactéries lactiques est extrêmement varié, reflétant leur capacité d'adaptation à divers environnements riches en sources carbonées. Dans le secteur de l'élevage bovin en Algérie, ces micro-organismes occupent plusieurs niches écologiques interconnectées. Le lait cru de vache constitue leur habitat primaire de prédilection en raison de sa composition riche en lactose, protéines et sels minéraux, offrant une matrice nutritive complète.

Cependant, avant d'atteindre le lait, elles colonisent activement le biotope animal, notamment la peau des mamelles, le canal du trayon et les muqueuses (buccale, intestinale et vaginale) de la vache. Elles sont également ubiquitaires dans l'environnement de la ferme, se trouvant dans les fourrages verts, l'ensilage, le sol de l'étable et l'eau d'abreuvement. Les pratiques de traite jouent un rôle de vecteur, où les équipements (seaux, machines à traire) peuvent héberger des biofilms de bactéries lactiques autochtones qui s'incorporent au lait lors de la collecte.

Cette diversité d'habitats permet une inoculation naturelle constante du lait, assurant une biodiversité microbienne qui est le fondement des caractéristiques typiques des produits laitiers artisanaux algériens (**Benamrouche, 2014**).

II.4. Caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) se distinguent par un ensemble de propriétés biologiques et physico-chimiques qui leur permettent de coloniser et de dominer la niche écologique lactée. Leurs caractéristiques peuvent être regroupées comme suit :

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

II.4.1. Caractéristiques morphologiques et cytologiques

Elles se présentent soit sous forme de coques (sphériques ou ovoïdes) groupées en chaînettes ou en paires (ex : *Lactococcus*, *Streptococcus*), soit sous forme de bacilles (bâtonnets) de dimensions variables (ex : *Lactobacillus*). Ce sont des bactéries à Gram positif, possédant une épaisse couche de peptidoglycane qui leur confère une rigidité structurelle et une protection contre la pression osmotique du lait. Elles sont non sporulantes, ce qui signifie qu'elles ne disposent pas de formes de résistance métabolique dormante. La grande majorité des souches isolées du lait cru sont immobiles.

II.4.2. Caractéristiques physiologiques et thermiques

On distingue les souches mésophiles (optimum entre 28°C et 32°C) et les souches thermophiles (optimum entre 40°C et 45°C, comme *S. thermophilus*). Elles sont aérotolérantes ; bien qu'elles n'utilisent pas l'oxygène pour respirer (absence de cytochromes), elles peuvent croître en sa présence. C'est une caractéristique clé ; elles sont capables de maintenir leur métabolisme actif même à des pH acides (inférieurs à 4.5), ce qui leur permet de stopper la croissance des bactéries de contamination.

II.4.3. Caractéristiques biochimiques et nutritionnelles

Les BL ont des besoins nutritionnels élevés (auxotrophie (exigences complexes)). Elles sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés et vitamines, qu'elles doivent puiser directement dans le lait. Elles fermentent le lactose pour produire de l'acide lactique, entraînant une baisse rapide du pH, essentielle pour la coagulation des protéines laitières. Certaines souches produisent des exopolysaccharides (EPS) qui améliorent la viscosité et l'onctuosité du produit fini (yaourts, fromages) (Wood, 1995).

II.5. Classification des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques a connu une révolution technologique, passant des critères purement morphologiques et biochimiques à une classification phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADN.

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

Actuellement, le séquençage du gène de l'ARNr 16S est la méthode de référence pour identifier les genres et les espèces avec précision. Cette approche moléculaire permet de regrouper les BL en plusieurs genres majeurs, chacun possédant des propriétés génétiques et technologiques distinctes.

La taxonomie moderne prend également en compte le profil de fermentation des sucres et la structure des acides gras membranaires.

Ces bactéries présentent une grande plasticité génomique, avec de nombreux gènes technologiques (comme ceux du métabolisme du lactose ou de la protéolyse) situés sur des plasmides, ce qui facilite les transferts horizontaux entre souches et favorise l'adaptation rapide aux changements de milieu dans le lait de vache.

II.5.1. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est caractérisé par des coques organisées en chaînettes. Dans l'industrie laitière, l'espèce *Streptococcus thermophilus* est la seule à avoir un statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe). Elle est thermophile et homofermentaire, produisant exclusivement de l'acide lactique L(+). Elle joue un rôle vital dans la fabrication du yaourt et de nombreux fromages à pâte pressée cuite. Sa croissance est souvent synergique avec celle des Lactobacilles, grâce à des échanges de métabolites (phénomène de protocoopération).

II.5.2. Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le plus vaste et le plus hétérogène de la classe des BL. Il regroupe des bâtonnets de tailles diverses, pouvant être homofermentaires ou hétérofermentaires. On les classe en trois groupes : les homofermentaires stricts, les hétérofermentaires facultatifs et les hétérofermentaires obligatoires. Ils sont extrêmement résistants à l'acidité et sont souvent utilisés comme probiotiques pour leurs effets bénéfiques sur la santé intestinale. En Algérie, les espèces *L. plantarum* et *L. casei* sont fréquemment isolées du lait de vache.

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

II.5.3. Le genre *Lactococcus*

Les *Lactococcus* (ex-Streptocoques du groupe N) sont des coques ovoïdes en paires ou chaînes courtes. Ils sont essentiels pour l'acidification initiale du lait. L'espèce *Lactococcus lactis* avec ses sous-espèces *lactis* et *cremoris* est le constituant majeur des ferments mésophiles. Leur métabolisme est principalement homofermentaire. Ils sont très appréciés pour leur capacité à produire des bactériocines et pour leur activité protéolytique qui contribue à la saveur des fromages.

II.5.4. Le genre *Leuconostoc*

Ce genre comprend des coques hétérofermentaires. Ils produisent de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO₂ à partir du glucose. Ils sont indispensables pour la production de diacétyle, une molécule aromatique qui donne au beurre et à certains laits fermentés algériens leur goût caractéristique. Leur production de gaz (CO₂) est également responsable de la formation des trous dans certains types de fromages.

II.5.5. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* se distinguent par leur division cellulaire en deux plans perpendiculaires, formant des tétrades. Ce sont des coques homofermentaires stricts. On les retrouve souvent dans la flore secondaire des fromages en cours de maturation longue. Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes et sont capables de croître dans des conditions de salinité modérée (Schleifer, 2009).

II.6. Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont considérées comme des microorganismes "fastidieux" en raison de leur incapacité à synthétiser par elles-mêmes de nombreux métabolites essentiels. Au cours de leur évolution dans des milieux extrêmement nutritifs comme le lait de vache, elles ont subi une réduction génomique, perdant les gènes nécessaires à la biosynthèse de novo de plusieurs composés. Par conséquent, leur croissance dépend strictement de la disponibilité de ces nutriments dans le milieu extérieur. Pour les cultiver au laboratoire, il est nécessaire d'utiliser des milieux complexes et enrichis tels que le milieu MRS (pour les

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

Lactobacilles) ou le milieu M17 (pour les Lactocoques et Streptocoques). Leurs exigences couvrent les sources de carbone, d'azote, les vitamines et les minéraux, faisant d'elles des indicateurs sensibles de la qualité nutritionnelle du lait.

*** Les glucides**

Le lactose est le principal substrat carboné utilisé par les BL dans le lait de vache. Son transport à l'intérieur de la cellule s'effectue soit par un système de symport (perméase), soit par le système des phosphotransférases (PTS). Une fois dans le cytoplasme, le lactose est hydrolysé en glucose et galactose par l'enzyme β -galactosidase ou la phospho- β -galactosidase. Le glucose est ensuite métabolisé par la voie de la glycolyse pour générer de l'énergie sous forme d'ATP.

*** Les acides aminés**

Les BL ne peuvent synthétiser qu'un nombre limité d'acides aminés. Elles ont un besoin impératif d'acides aminés essentiels tels que la valine, la leucine, l'isoleucine et la méthionine. La concentration d'acides aminés libres dans le lait de vache étant insuffisante pour soutenir une croissance maximale, elles ont développé un système protéolytique complexe pour dégrader les protéines laitières et libérer les monomères nécessaires.

***L'azote**

La source d'azote pour les BL est principalement organique. Elles utilisent les protéines du lait (caséines) grâce à des protéases ancrées à leur paroi cellulaire (PrtP). Ces enzymes fragmentent les protéines en peptides, qui sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques (Opp) avant d'être découpés en acides aminés par une batterie de peptidases intracellulaires.

*** Les vitamines**

Les vitamines du groupe B sont indispensables au métabolisme des BL. Elles agissent comme co-facteurs enzymatiques dans les réactions de transfert d'énergie. La biotine, la niacine, la riboflavine et l'acide pantothénique sont souvent requis. Certaines souches de

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

Lactococcus isolées en Algérie ont montré des besoins spécifiques en acide folique, ce qui reflète leur adaptation locale.

* Les minéraux

Les ions métalliques sont cruciaux pour l'activité catalytique de nombreuses enzymes internes. Le magnésium (Mg^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}) sont les plus importants. Le manganèse, en particulier, est utilisé par certaines BL pour neutraliser les radicaux libres toxiques (stress oxydatif), compensant ainsi l'absence de l'enzyme catalase chez ces bactéries.

*L'oxygène

Bien que les BL soient anaérobies, la plupart sont aérotolérantes. Elles n'utilisent pas l'oxygène pour leur métabolisme énergétique, mais possèdent des enzymes (comme la NADH oxydase) qui leur permettent de réduire l'oxygène moléculaire présent dans le lait. Cependant, une exposition excessive à l'oxygène peut ralentir leur croissance en raison de la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qu'elles ne peuvent dégrader par la catalase (Kihal, 2006).

II.7. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Le métabolisme des sucres chez les bactéries lactiques est un processus biochimique hautement spécialisé qui se divise en deux catégories majeures selon les produits finaux générés et les enzymes impliquées. Cette distinction est fondamentale en technologie laitière car elle détermine l'acidité finale, le goût et la texture du produit. La voie homofermentaire est privilégiée pour une acidification rapide et intense, nécessaire à la formation du caillé, tandis que la voie hétérofermentaire est recherchée pour le développement de l'arôme et de la structure du produit fini grâce à la production de composés volatils (Mayo *et al.*, 2010).

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

Tableau 02 : principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Critère de comparaison	Voie Homofermentaire	Voie Hétérofermentaire
Voie biochimique utilisée	Embden-Meyerhof-Parnas (Glycolyse)	Voie des Pentoses-Phosphates
Enzyme clé	Aldolase	Phosphocétolase
Produit final dominant	Acide Lactique (> 90%)	Acide Lactique, Éthanol, CO ₂
Rendement en ATP	2 ATP par molécule de glucose	1 ATP par molécule de glucose
Genres représentatifs	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>

II.8. Les molécules à activité antimicrobienne synthétisées

L'une des fonctions les plus précieuses des bactéries lactiques dans le lait de vache est leur capacité à inhiber la croissance de la microflore pathogène et d'altération (telle que les entérobactéries, les staphylocoques et les listeria). Cette activité antimicrobienne repose sur la synthèse et la sécrétion d'un cocktail de molécules actives. Ce phénomène de biopréservation naturelle est au cœur des recherches actuelles pour réduire l'utilisation de conservateurs chimiques. L'étude de ces molécules est cruciale car la production de certaines d'entre elles est régulée par des systèmes de communication cellule-à-cellule (Quorum Sensing) et leurs gènes sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons).

* Les acides organiques

La production massive d'acide lactique et, dans une moindre mesure, d'acide acétique, provoque une baisse rapide du pH du lait. Cette acidification déstabilise la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles, interfère avec leur potentiel membranaire et inhibe le transport des nutriments essentiels. L'effet est particulièrement marqué contre les germes de contamination fécale souvent présents dans le lait cru de vache collecté de manière artisanale.

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

***Le peroxyde d'hydrogène**

En présence d'oxygène, de nombreuses BL produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à des enzymes comme la NADH-oxydase. Comme les BL sont catalase-négatives, elles ne dégradent pas ce composé, qui s'accumule dans le milieu. Le H_2O_2 exerce un effet oxydant puissant sur les protéines et les lipides membranaires des bactéries catalase-positives (comme les staphylocoques), entraînant leur mort cellulaire.

***Le dioxyde de carbone**

Le CO_2 produit par les souches hétérofermentaires (comme *Leuconostoc*) remplace l'oxygène dissous dans le lait. Cette modification de l'atmosphère crée un environnement anaérobie qui est létal pour les micro-organismes aérobies stricts responsables de l'altération précoce du lait, tout en favorisant la croissance de la flore lactique bénéfique.

***Le diacétyle**

Bien que connu principalement pour son arôme de beurre, le diacétyle possède une activité antimicrobienne intrinsèque. Il agit en interférant avec l'utilisation de l'arginine par les bactéries à Gram négatif, perturbant ainsi leur métabolisme protéique. Son action est synergique avec celle des acides organiques produits durant la fermentation.

*** Les bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides de petite taille, de nature protéique, synthétisés par les ribosomes et possédant une activité bactéricide ciblée. La nisine, produite par *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la plus étudiée et la seule autorisée mondialement comme conservateur biologique. Elles agissent en créant des pores dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible, provoquant une fuite massive d'ions et la dissipation de la force protonmotrice. En Algérie, de nombreuses études ont mis en évidence des souches de *Lactococcus* et de *Lactobacillus* isolées du lait de vache produisant des bactériocines puissantes contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Zacharof et Lovitt, 2012).

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

II.9. Propriétés technologiques des bactéries lactiques

Les propriétés technologiques des BL sont les critères de sélection pour leur utilisation comme ferments industriels ou artisanaux. Dans le contexte du lait de vache, elles assurent plusieurs fonctions vitales :

- **Pouvoir acidifiant** : c'est l'aptitude à abaisser rapidement le pH du lait par la production d'acide lactique. Une acidification rapide est indispensable pour la formation du caillé et pour limiter le développement de la flore pathogène dès les premières heures de la fermentation.

- **Pouvoir protéolytique** : grâce à leurs enzymes (protéases et peptidases), les BL dégradent les caséines du lait. Ce processus libère des peptides et des acides aminés qui sont non seulement essentiels pour la croissance bactérienne, mais qui jouent également un rôle crucial dans le développement de la texture et du goût (flaveur) des produits laitiers transformés.

- **Production de composés aromatiques** : la fermentation du citrate et de certains acides aminés génère des molécules volatiles comme le diacétyle, l'acétoïne et l'acétaldéhyde. Ces composés confèrent au Raïb, au Lben

- **Production d'exopolysaccharides (EPS)** : certaines souches sécrètent des polymères de sucres à l'extérieur de leur cellule. Ces EPS agissent comme des stabilisants naturels, augmentant la viscosité et améliorant la rétention d'eau, ce qui donne une texture lisse (Corrieu et Luquet, 2008)

II.10. Utilisation des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques est devenue incontournable dans le paysage agroalimentaire et médical actuel. Leur application se décline en trois axes majeurs :

***Comme ferments lactiques (starters)**

Ils sont utilisés pour standardiser et sécuriser la production à grande échelle de yaourts. En Algérie, l'utilisation de ferments sélectionnés permet de passer d'une production artisanale aléatoire à une production industrielle contrôlée tout en préservant le goût traditionnel.

CHAPITRE II : Les bactéries lactiques

* Dans la bio-préservation

Grâce à leur arsenal antimicrobien (acides, bactériocines), les BL sont utilisées comme conservateurs biologiques pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires sans avoir recours à des additifs chimiques. C'est une solution d'avenir pour le marché algérien qui cherche à valoriser les produits naturels.

* Comme probiotiques

De nombreuses souches de *Lactobacillus bifidobacterium* sont incorporées dans les aliments pour leurs bénéfices santé démontrés. Elles aident à rééquilibrer le microbiote intestinal, renforcent le système immunitaire et peuvent prévenir certaines infections gastrointestinales. L'isolement de souches probiotiques à partir du lait de vache algérien est un domaine de recherche très actif pour développer des produits adaptés à la santé de la population locale (Parvez *et al.*, 2006).

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

Matériel et méthodes

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.1. Objectif du travail

Ce chapitre constitue la partie fondamentale de notre étude expérimentale. Il a pour objectif de détailler avec précision l'ensemble des protocoles mis en œuvre pour l'isolement, la purification et l'identification phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un échantillon du lait de vache cru de la région de Mezegrane-Mostaganem.

III.2. Lieu et période de l'étude

La partie expérimentale de ce mémoire a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie (labo 2), rattaché à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mostaganem. Les travaux de laboratoire se sont étalés sur une période de trois mois, allant de 01 mars à 05 mai 2026.

Cette période a été divisée en phases distinctes : échantillonnage, isolement primaire, cycles de purification, et tests de caractérisation biochimique.

III.3. Matériel biologique et échantillonnage

III.3.1. Matériel biologique

Le matériel biologique de base est constitué du lait de vache cru. Ce choix est justifié par la richesse naturelle de ce produit en bactéries lactiques d'intérêt technologique et probiotique.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.4. L'échantillonnage et protocole de prélèvement du lait

Notre étude s'est déroulée dans la région de Mostaganem, ciblant plusieurs exploitations laitières. Le prélèvement spécifique décrit concerne un sujet sélectionné pour l'isolement de bactéries lactiques : une vache laitière de race Holstein, Boucle n° 3465 (Âge : 4 ans) ; et un état physiologique d'anoestrus (absence de cycle) avec un historique de vèlage ou pathologie remontant à deux ans, une condition pouvant influencer la diversité du microbiote mammaire.

Pour assurer la validité des résultats microbiologiques, un protocole d'échantillonnage aseptique rigoureux a été appliqué :

- **Préparation des contenants** : utilisation de flacons en verre d'une capacité de 250 ml, préalablement lavés et stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.
- **Préparation de la mamelle** : nettoyage soigneux des trayons à l'aide d'une solution antiseptique et séchage avec des serviettes à usage unique pour minimiser la flore de contamination environnementale.
- **Prélèvement** : les premiers jets du lait ont été systématiquement éliminés. Le lait de milieu de traite a été recueilli directement dans les flacons stériles.
- **Transport et conservation** : après prélèvement, les flacons ont été immédiatement étiquetés et placés dans une glacière isotherme à $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les échantillons ont été acheminés au laboratoire dans un délai n'excédant pas deux heures

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

Tableau 03 : paramètre du protocole de prélèvement, de conservation et de transport des échantillons de lait

Paramètre	Spécification
Identification	Étiquetage immédiat des flacons
Température	Conservation en glacière isotherme à $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
Délai de transport	Acheminement au laboratoire en moins de 2H

III.5. Isolement et purification des souches

L'isolement des bactéries lactiques est fait après incubation à 37°C jusqu'à coagulation du lait (**Badis *et al.*, 2005**)

La suspension mère est diluée successivement dans un diluant stérile (eau physiologique ou eau peptonnée) on répète l'opération jusqu'à la dilution souhaitée. Puis un ensemencement dans la boîte de Pétri (contient le milieu de culture solide), déposer $100\ \mu\text{L}$ de suspension à la surface du milieu de culture coulé et solidifié. Puis constituer un râteau (étaioir) à l'aide d'une pipette Pasteur en verre et étaler la goutte de suspension par ce râteau, puis l'incuber à 37°C pendant 72h.

Après incubation, des colonies isolées et représentatives ont été choisies à partir de la gélose d'ensemencement initial. Pour obtenir des cultures pures, ces colonies ont été repiquées par la méthode des stries successives sur un nouveau milieu gélosé. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention de souches totalement purifiées, prêtes pour l'identification phénotypique.

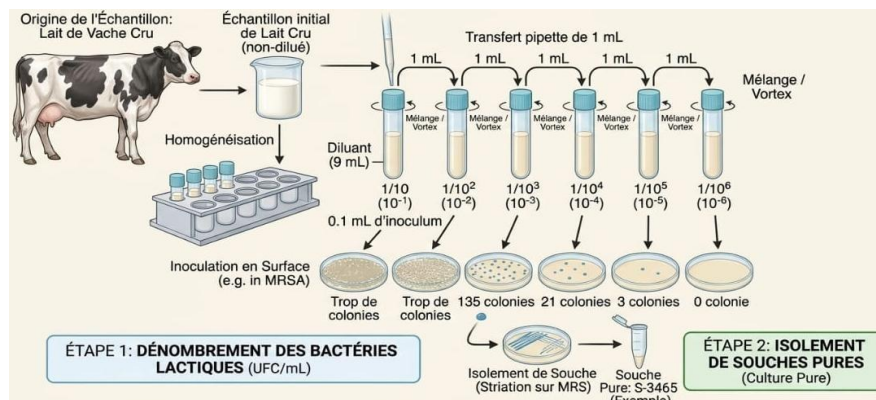


Figure 03 : dénombrement et isolement de bactéries lactiques à partir du lait de vache cru

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.6. Caractérisation et identification des souches lactiques

Après avoir obtenu des cultures homogènes, plusieurs tests ont été réalisés pour l'identification des souches. Les méthodes classiques d'identification des souches se basant sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques, ont été reprises dans ce travail. Les méthodes basées sur l'évaluation du phénotype restent, pour l'instant, très valables et, à bien des égards, irremplaçables (Marconi *et al.*, 2000).

III.6.1 Etude morphologique

L'étude morphologique des bactéries lactiques est une étape fondamentale dans leur caractérisation préliminaire. Elle consiste à déterminer les caractéristiques morphologique et structurale des cellules bactériennes, tant au niveau macroscopique (aspect des colonies sur gélose) qu'au niveau microscopique (forme cellulaire, mode de regroupement et affinité à la coloration de Gram).

L'observation est réalisée sur des boîtes de 48h. Les paramètres consignés sont la taille (mesurée au pied à coulisse), la forme, le relief, l'opacité et la couleur des colonies.

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des microorganismes, elle comprend un examen après coloration de Gram.

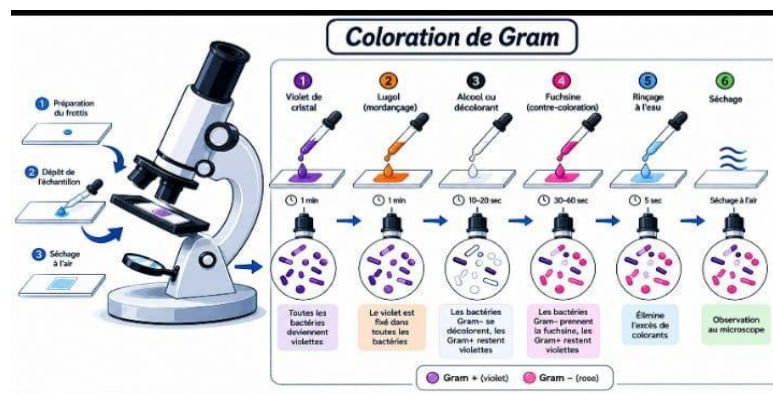


Figure 04 : Étapes de la coloration de Gram et observation microscopique des bactéries.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.6.2. Tests physiologiques et biochimiques

III.6.3. Test de la catalase

Est une épreuve biochimique clé utilisée pour détecter la présence de l'enzyme catalase, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2). Ce test est fondamental pour différencier les genres bactériens, notamment pour distinguer les staphylocoques (catalase positifs) des streptocoques (catalase négatifs) (De Vos *et al.*, 2009).

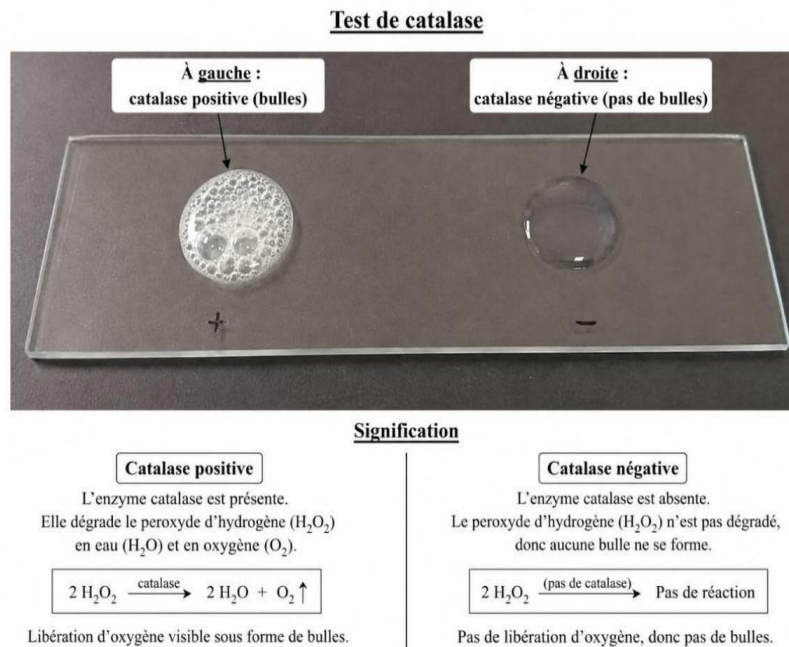


Figure 05 : test de catalase montrant une réaction positive et négative.

III.6.4. Test de croissance à différente température (30°C, 37°C, 44°C)

C'est une méthode microbiologique permettant d'évaluer la capacité des bactéries lactiques à croître à différentes températures d'incubation afin de déterminer leur température optimale de croissance et leur tolérance thermique (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

Le milieu de culture liquide (MRS ou M17) est préparé selon les instructions du fabricant, réparti à raison de 5 à 10 mL par tube à essai, chaque tube est inoculé avec un volume standardisé de 1% à 2% de la culture bactérienne préalablement ajustée. Les tubesensemencés sont répartis et placés dans les différentes étuves réglées aux températures suivantes :

-10°C et 15°C : incubation pendant 3 à 7 jours (la croissance étant ralentie à basse température).

-42°C et 45°C : incubation pendant 24 à 48 heures.

Un tube témoin est systématiquement incubé à la température optimale 37°C pour valider la viabilité et la bonne croissance de la souche testée (Larpen, 1997).

III.6.5. Test de croissance à différent pH (9.6, 6.5, 5)

La croissance à pH=9.6, c'est de différencier entre *Enterococcus* sp. et *Streptococcus thermophilus*. Après ensemencement dans le milieu MRS à pH=9.6, la culture est incubée à 37°C pendant 24h. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble dans le tube (VeraPeña et Rodriguez, 2023).

III.6.6. Test de croissance en présence de NaCl

L'évaluation de la halotolérance est un critère taxonomique fondamental pour la caractérisation et la différenciation des bactéries lactiques. Ce test consiste à évaluer la capacité des isolats à croître dans un milieu liquide (bouillon MRS) enrichi en chlorure de sodium (NaCl) à une concentration 6,5%.

Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la croissance est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (turbidité) dans le tube, indiquant un résultat positif. En

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

revanche, l'absence de croissance (milieu limpide) traduit une sensibilité à la pression osmotique.

Ce test permet notamment de distinguer le genre *Enterococcus* (halotolérant) du genre *Lactococcus* (De Vos *et al.*, 2009 ; Holzapfel et Wood, 2014).

III.6.7. Test de thermorésistante

La thermorésistante est réalisée pour les cocci; un chauffage du milieu est réalisé dans un bain-marie à une température de 60°C pendant 30 min est testé en utilisant le milieu M17/MRS liquide et mettre à l'étude 24h à 37°C (Stiles et Holzapfel, 1997; Teuber et Geis, 2006).

* Tests biochimiques

Les tests biochimiques constituent une étape fondamentale et indispensable dans le processus d'identification phénotypique des micro-organismes, en particulier des bactéries lactiques. Ces tests reposent sur la mise en évidence des propriétés métaboliques et enzymatiques spécifiques de chaque souche bactérienne. Ils permettent d'étudier la capacité d'une bactérie à utiliser ou à dégrader certains substrats (tels que les glucides, les acides aminés ou les lipides) ou à produire des enzymes clés (comme la catalase, l'oxydase ou la gélatinase).

L'expression de ces profils biochimiques, propre à chaque entité biologique, fournit des critères taxonomiques précis permettant de différencier et de classer les isolats bactériens du niveau du genre jusqu'à l'espèce (MacFaddin, 2000 ; Willey *et al.*, 2019).

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.6.9. Production de l'acétoïne (Acétyl-Méthyle-Carbinol)

Sur milieu de Clark et Lubs, et après ensemencement des souches et incubation à 37°C pendant 24 à 48 h. La production de l'acétoïne est testée par la réaction de Vogues Proskauer (VP) est s'applique de la façon suivante : dans un tube à essai on introduit 1ml de la culture à tester, on ajoute 5 gouttes du réactif VPI (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VPII (α - naphtol à 6% dans l'alcool à 95%). On agite soigneusement les tubes et laisse reposer 5 à 10 min à température ambiante. Le test positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, après 10 min (**Guiraud, 1998**).

III.6.8. Recherche du type fermentaire (production de CO₂)

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS, dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 37°C pendant 48h (**Garvie, 1986**).

III.6.10. Etude du profil fermentaire (fermentation des sucres)

L'étude du profil fermentaire des souches est effectuée par ensemencement des souches lactiques dans des tubes contenant le milieu de base pour fermentation (MRS/M17 bouillon contenant du pourpre de bromocrésol BCP comme indicateur de pH) dans lequel on ajoute du sucre et enfin une couche de l'huile de paraffine.

Après 48 heures d'incubation à 37°C, tous les sucres fermentés virent au jaune c'est-à-dire le virage de la couleur au jaune, désigne l'utilisation du sucre par les bactéries. Les

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

sucres utilisés sont : lactose, galactose, fructose, mannitol, maltose, sucrose, glucose, glycine (Saidi *et al.*, 2002).

III.7. Technique de conservation

III.7.1. Conservation à court terme

Les souches sont conservées dans le milieu MRS solide incliné dans des tubes à essais stériles. Après ensemencement et incubation en condition optimale de 37°C pendant 48h, les tubes sont conservés au réfrigérateur à (-4°C) pendant 3 à 4 semaines, et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (Leclerc *et al.*, 1977 ; Badis, 2004).

III.7.2. Conservation à long terme

On ensemence les souches dans un milieu de base liquide. Après incubation en condition optimale, on centrifuge la culture jeune dans des tubes Eppendorfs à 3000 tours pendant 5 minutes et on ajoute au culot obtenu le mélange de 70% lait écrémé et de 30% glycérol pure puis on conserve à (-20°C) au congélateur (Kihal, 1996 ; Moulay *et al.*, 2006).

III.8. Préparation des isolats pour l'identification génotypique

Dans le but de vérifier la pureté et les caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache cru, quatre isolats initiaux ont été sélectionnés et réactivés par ensemencement dans du bouillon MRS. La confirmation de l'appartenance au groupe des bactéries lactiques a été effectuée à travers la coloration de Gram et le test de la catalase. Les quatre souches retenues (G1, G2, G5 et G6) se sont révélées être des bacilles à Gram positif et catalase négatifs.

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

La densité optique (DO: 600nm) a été mesurée par spectrophotométrie afin de contrôler la masse cellulaire en phase exponentielle de croissance, donnant des valeurs d'absorbance respectives de 0,731 (G1), 0,632 (G2), 0,658 (G5) et 0,659 (G6).

Enfin, la conservation à long terme des quatre souches sélectionnées a été réalisée par cryopréservation : les culots bactériens ont été récupérés par centrifugation à 3000 tr/min, puis remis en suspension et additionnés de glycérol stérile à une concentration finale adéquate (v/v), avant d'être conservés à basse température (-20°C) en vue de leur identification génétique ultérieure.

III.8.1. Identification génotypique des isolats

L'identification génotypique des bactéries lactiques sélectionnées a été réalisée au niveau du laboratoire spécialisé en biologie moléculaire New Applied Systems in Microbiologies (N.A.S.I.M), Constantine, Algérie, durant la période allant du 22 au 27 août 2026.

La méthode utilisée repose sur l'identification génotypique par REP-PCR, notamment la technique (GTG)₅-PCR. Cette approche comprend principalement l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification par PCR, la séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose et la comparaison des profils électrophorétiques obtenus avec ceux des souches de référence.

***Matériel biologique**

Les analyses ont été réalisées sur quatre isolats de bactéries lactiques sélectionnés, ainsi que sur des souches de référence ATCC. Les isolats étudiés étaient notamment les

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

suivants: G1, G2, G5 et G6.

Les souches de référence utilisées étaient : *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 et *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 9338. Des souches témoins du laboratoire, ST1 et ST4, ont également été utilisées pour la comparaison des profils électrophorétiques.

III.8.2. Extraction de l'ADN génomique

Les isolats présumés de bactéries lactiques conservés par cryoconservation ont d'abord été revitalisés sur milieu gélosé MRS à pH optimisé. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 72 heures en conditions d'anaérobiose.

À partir d'une colonie isolée caractéristique, une suspension bactérienne a été préparée dans 1 mL d'eau purifiée stérile. La suspension a ensuite été centrifugée à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Le culot bactérien obtenu a été congelé à -20 °C pendant une heure. Le culot a ensuite été lavé avec 1 mL de tampon TES puis remis en suspension dans 300µL de tampon STET. Un volume de 75µL de tampon de lyse a été ajouté, suivi d'une incubation à 37°C pendant une heure.

Ensuite, 40µL d'une solution de SDS à 20 % ont été ajoutés dans un tampon TE composé de 10 mM de Tris-HCl et de 1 mM d'EDTA à pH 8,0. Une agitation au vortex a été effectuée pendant 60 secondes, suivie d'une incubation à 37 °C pendant 10 minutes, puis à 65°C pendant 10 minutes avec ajout de 100 µL de tampon TE.

L'extraction du lysat a été réalisée à l'aide d'un volume égal d'un mélange de phénol, chloroforme et alcool isoamylique. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 20 minutes, la phase aqueuse a été récupérée. Cette dernière a été mélangée avec 70µL de NaCl 5 M et

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

1mL d'isopropanol. L'ADN a été précipité sur glace pendant 15 à 20 minutes, puis récupéré par centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 à 20 minutes.

Le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 70 % refroidi à 8 ± 2 °C. Après une nouvelle centrifugation pendant 10 minutes, l'ADN purifié a été dissous dans de l'eau pure stérile et préparé pour la REP-PCR ou conservé à -20 °C.

III.8.3.Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été contrôlées par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo Scientific™ (réf. 840-210600). La pureté de l'ADN a été évaluée à partir des rapports d'absorbance A260/A280 et A260/A230. Selon le protocole utilisé, un ADN considéré comme pur présente un rapport A260/A280 compris entre 1,8 et 2,0 et un rapport A260/A230 supérieur à 2,0.

III.8.4.Amplification de l'ADN par REP-PCR

L'amplification de l'ADN extrait a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur T100 de Bio-Rad. Le mélange réactionnel était constitué de 20µL de solution mixte auxquels ont été ajoutés 4µL d'ADN génomique extrait.

Le mélange réactionnel comprenait : solution tampon : 2,5 µL ; dNTP : 2 µL ; amorce Forward : 0,5 µL ; amorce Reverse : 0,5 µL ; Taq polymérase : 0,25 µL ; eau distillée stérile : 14,25 µL.

Une prédénaturation a été réalisée à 94°C pendant 15 minutes. Elle a été suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, une hybridation à 53°C

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une extension finale a ensuite été réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

III.8.5.Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification obtenus par (GTG)₅-PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %. Pour préparer le gel, 1,2 g d'agarose déshydraté ont été dissous dans 100 mL de tampon TBE. Le mélange a été chauffé à la micro-ondes pendant 4 minutes. Après refroidissement à une température comprise entre 45 et 50°C, 10µL de bromure d'éthidium (BET) ont été ajoutés. Le gel a été coulé dans le moule d'électrophorèse et laissé refroidir pendant environ 25 à 30 minutes afin de permettre sa solidification.

Pour le dépôt, 7µL d'ADN amplifié ont été mélangés avec 5µL de solution de charge contenant du bleu de bromophénol. Le mélange a ensuite été déposé dans les puits du gel. La migration électrophorétique a été réalisée à une tension comprise entre 90 et 100 V pendant environ 40 minutes.

III.8.6.Visualisation des produits d'amplification

Après migration, les fragments d'ADN ont été visualisés grâce au bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques.

La visualisation du gel a été réalisée à l'aide d'un système d'imagerie pour gel d'électrophorèse « Labomoderne », équipé d'un appareil photo numérique CSL15. Le traitement et l'analyse des gels ont été effectués à l'aide du logiciel CSL 030.

III.8.7.Comparaison et analyse des profils

Les profils électrophorétiques obtenus ont été comparés à ceux des souches de référence ATCC utilisées dans l'étude. Les séquences obtenues ont également été comparées aux séquences disponibles dans la banque de données GenBank à l'aide du programme BLAST du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

L'analyse des profils électrophorétiques et leur comparaison ont permis d'établir un dendrogramme basé sur le coefficient de corrélation de Pearson (tableau 4).

Tableau 4 : Séquence des amorces spécifiques utilisées en PCR de la firme Qbiogène Research Service Germany

Amorce	Séquence	Sens
Pour <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	5'-TCTAATGTAAATCATGATGG-3' 3'-GCCCATCTTTAAGACCATCG-5'	Sens Anti- sens
Pour <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	5'-GCGACCAAAATCAATCAGGC-3' 3'-AAGTGTTATGGGCCTAGTCA-5'	Sens Anti- sens

Le tableau suivant résume les souches de références ATCC utilisées (en utilisant les séquences de leurs gènes 16S rRNA (tableau 6)) Fab : 08/07/2025 et DLU : 07/07/2028.

Tableau 5 : Les souches de références ATCC utilisées

Nom de la souche de référence du gène 16SrRNA
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC 9338

Tableau 6 : Caractéristiques moléculaires et amorces de PCR des souches de référence ATCC

Souche cible	Séquence (5'-3' / 3'-5')	RS ATCC	Numéro d'accès GenBank (ARNr 16S)	Taille du fragment PCR
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	For: GCGACCAAAATCAATCAGGC Rev: AAGTGTTATGGGCCTAGTCA	ATCC 9338	M58821	570 bp
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	For: GGTATTGATTGGTGCTTGCA Rev: TCGGTTACAGACTTTAATACC	ATCC 8014	MN326667	610 bp

Chapitre IV :

Résultats et discussion

CHAPITRE IV : résultats et discussion

IV.1. Résultats

IV.2. Caractérisation du lait utilisé

Il est caractérisé par la légèreté du fromage à la crème et sa couleur blanc-brun typique, qui peut tendre vers le jaune en raison de la présence de picrotine soluble dans le transformateur, et par une texture huileuse sans grumeaux ni viscosité, en plus d'un goût sucré agréable grâce au lactose et d'un arôme distinctif, tandis que toute déviation par rapport à cette technique (comme l'apparition d'une couleur rose, ou d'un goût salé et acide, ou d'odeurs étranges et de rancissement) est directement considérée comme la présence de problèmes de santé (tels que la mammite) ou d'une infection bactérienne et d'un manque de conditions particulières lors de la traite et du stockage (Alloush, 2018 ; Fignola, 2002).

Le pH du lait de vache cru et frais est un indicateur clé de sa qualité. Normalement compris entre 6.5 et 6.7 (légèrement acide), ses variations révèlent l'état sanitaire et de conservation du lait :

- Un pH inférieur à 6.5 signale une contamination bactérienne avec fermentation du lactose en acide lactique, résultant d'un stockage inadéquat.
- Un pH supérieur à 6.7 est souvent le signe d'un lait mammitique (provenant d'une vache atteinte de mammite).

IV.2.1. Caractérisation macroscopique

Sur milieux solides MRS, la croissance a été fortement étudiée, tant macroscopiquement que microscopiquement, après une incubation de 48h à 37°C. L'évaluation a porté sur la formation de colonies, avec les résultats suivants : forme et

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

hauteur (colonies modérément bombées), aspect (noires, collantes et réceptives), diamètre (0,5 à 1 mm, caractéristiques des bactéries lactiques) (tableau 7).

Tableau 07 : Description morphologique et macroscopique des isolats bactériens

Dilution	Groupe	Forme	Taille	Couleur	Bords	Élévation	Surface	Opacité
10-3	G3	Circulaire	1 à 2mm	Beige	Nets et réguliers	Bombé	Lisse et brillant	Opaque
10-3	G4	Circulaire	Grand	Beige	Nets	Bombé	Lisse	Opaque
10-4	G2	Circulaire	Petite	Beige	Réguliers	Bombé	Lisse	Opaque
10-5	G2	Circulaire	Petite	Beige	Réguliers	Bombé	Lisse	Opaque
10-6	G1	Circulaire	1 à 2mm	Beige	Nets et réguliers	Bombé	Lisse	Opaque

IV.2.2. Caractérisation microscopique

IV.2.2.1 Résultats de la coloration de Gram

L'examen microscopique, après coloration de Gram, des colonies bactériennes isolées d'échantillons du lait de vache a révélé que les bactéries lactiques étudiées étaient Gram positives.

Les cellules apparaissaient violet foncé au microscope optique en raison de leurs parois cellulaires épaisses de peptidoglycane retenant le colorant primaire (violet de gentiane) et résistant à la coloration inverse.

Du point de vue morphologique et structural, les isolats présentaient deux caractéristiques principales permettant de distinguer les bactéries lactiques du lait (figure 6):

- Bacilles Gram positifs : ces cellules se présentaient sous forme de bâtonnets allongés (isolées ou en chaînettes), évoquant initialement le genre *Lactobacillus*.
- Cocci Gram positifs : ces cellules se présentaient sous forme de cellules sphériques ou ovales (par paires ou en chaînettes courtes à moyennes), évoquant initialement les genres *Lactococcus* ou *Streptococcus*.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

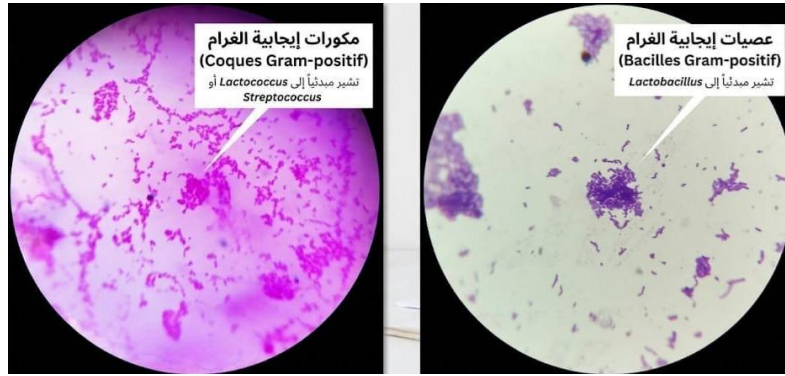


Figure 06 : Aspect microscopique après coloration de Gram (G x 100) de bactéries isolées.

IV.3. Les tests physiologiques

Afin d'affiner l'orientation morphologique initiale illustrée par la figure 06 et de confirmer l'identité de nos isolats, il a été indispensable de réaliser une série de tests physiologiques et biochimiques complémentaires. Ces critères de caractérisation approfondie permettront, par la suite, de structurer et de répartir de manière rigoureuse l'ensemble de nos isolats.

IV.3.2. Recherche de catalase

L'épreuve de la catalase revêt une importance capitale en microbiologie, car elle constitue un outil clé pour la différenciation des grands groupes taxonomiques bactériens. L'analyse a mis en évidence que l'ensemble des souches isolées présente une réaction négative au test de la catalase.

IV.3.3. La croissance à différents pH

L'étude comparative du développement des bactéries lactiques isolées du lait de vache à différents pH (5, 6.5 et 9.5) met en évidence la forte influence de l'acidité et de l'alcalinité du milieu sur leur cinétique de croissance (figure 7).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

À pH 6.5, correspondant à la zone de neutralité proche du pH naturel du lait frais, ces micro-organismes atteignent leur croissance optimale, caractérisée par une turbidité maximale et opaque du milieu, un dépôt cellulaire important et une production notable de mousse en surface.

Cet intense activité métabolique se maintient de manière très satisfaisante au pH 5, où le milieu présente également un trouble homogène et une formation de bulles, ce qui démontre le caractère acidotolérant remarquable de ces souches, une propriété technologique clé liée à leur métabolisme fermentaire producteur d'acides.

En revanche, au pH alcalin de 9.5, on observe une inhibition drastique de la prolifération bactérienne, se traduisant par une limpidité relative du bouillon de culture. Ce milieu basique perturbe gravement l'homéostasie cellulaire et inactive les systèmes enzymatiques vitaux de ces bactéries. En conclusion, les souches de bactéries lactiques étudiées se révèlent être majoritairement neutrophiles et acidotolérantes, mais hautement sensibles aux milieux alcalins.

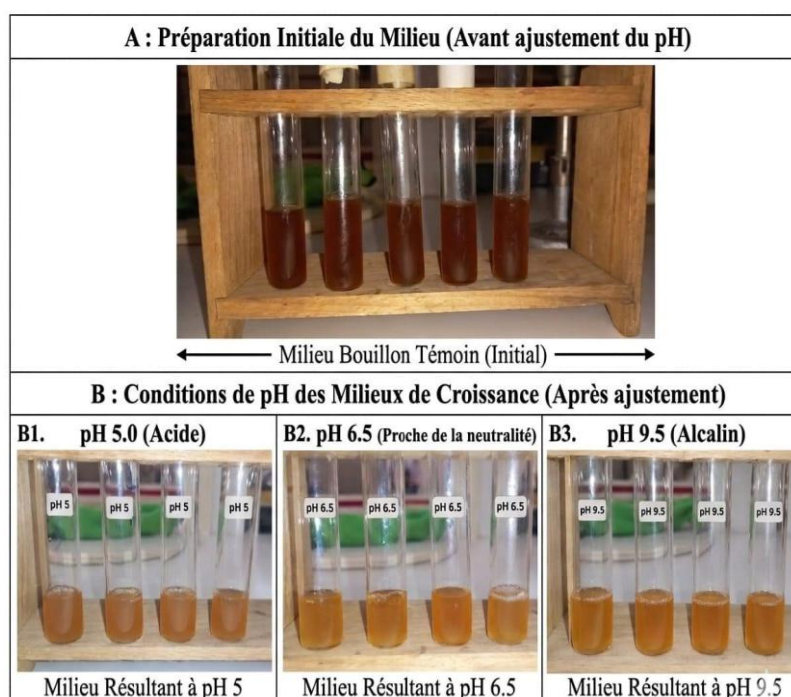


Figure 07 : la croissance à différents pH.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.3.4. La croissance à différentes températures

L'étude de l'effet de la température d'incubation a révélé une nette variation physiologique de la capacité de croissance selon les différentes températures utilisées (30°C, 37°C et 44°C), ce qui constitue un critère taxonomique essentiel pour la détermination des groupes physiologiques au sein de ce genre (figure 8, tableau 8).

La croissance optimale de certaines souches isolées (S1, S2, S3, S4) à 37°C indique leur nature mésophile (bactéries lactiques mésophiles), tandis que la croissance active et continue d'autres souches (S5, S6) à une température élevée de 45°C reflète leur adaptation en tant que bactéries thermophiles (bactéries lactiques thermophiles).

Cette biodiversité physiologique témoigne de l'adaptation de ces souches à l'écosystème du lait cru et de leur potentiel prometteur pour les applications biotechnologiques et l'industrie agroalimentaire.

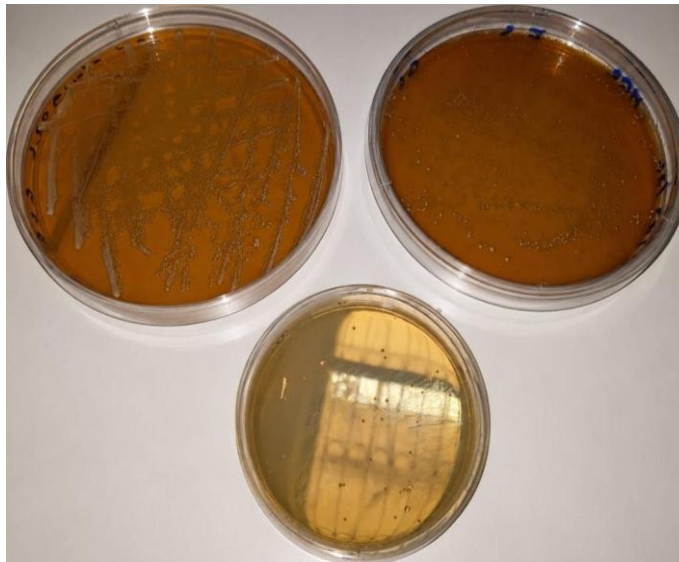


Figure 08 : La croissance à différentes températures des isolats.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Tableau 08 : comparaison du profil de croissance des isolats en fonction de la température.

Température d'incubation	Intensité globale	Aspect macroscopique	Densité de la charge bactérienne
30 °C	Faible (+)	Colonies isolées, de très petite taille (punctiformes), développement fortement ralenti à la surface de la gélose.	Charge minimale restrictive
37 °C	Maximale (+++)	Prolifération optimale, colonies très denses, volumineuses et confluentes. Activité métabolique et cinétique à son apogée.	Densité optimale absolue
44 °C	Excellente (++/+++)	Forte croissance, colonies abondantes et bien visibles, mais présentant une densité légèrement inférieure à celle observée à 37 °C.	Charge élevée résiliente

IV.3.5 Test de la thermorésistante

La résistance à la chaleur est une caractéristique physiologique qui permet de distinguer les souches capables de supporter une température de 60°C pendant 30 minutes maximum. D'après les résultats de notre étude, l'apparition d'un trouble dans les tubes est un résultat positif et indique que les souches S1, S2, S3 et S4 sont thermophile.

IV.3.6. Croissance en milieu hypersalé

L'évaluation de la capacité de croissance de nos souches bactériennes à différentes concentrations de NaCl a donné les résultats suivants : après incubation, la croissance bactérienne est mise en évidence par l'apparition d'un trouble net dans les tubes. La présence d'un trouble homogène dans les tubes après incubation témoigne d'une tolérance positive vis-à-vis du NaCl (6,5%).

IV.3.7. Production de l'acétoïne (Acétyle-Méthyle-Carbinol)

Le test de production d'acétoïne s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, n'affichant aucun changement de couleur.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.3.8. Recherche du type fermentaire (production de CO₂)

Les résultats montrent que l'ensemble des souches isolées sont homofermentaires, puisqu'aucune production de gaz n'a été observée (figure 9, tableau 9).



Témoin Après l'incubation
Figure 09 : test du type fermentaire.

Tableau 09 : type fermentaire et production de l'acétoïne.

Souche	Homo-fermentaire	Hétéro-fermentaire	Acétoïne
S1	+	-	-
S2	+	-	-
S3	+	-	-
S4	+	-	-
S5	+	-	-
S6	+	-	-

IV.3.9. Etude du profil fermentaire (fermentation des sucres)

La différenciation des taxons bactériens s'appuie essentiellement sur leur potentiel à fermenter les glucides avec production d'acides organiques. L'investigation de ces profils fermentaires démontre une importante variabilité métabolique au sein des isolats (figure 10, tableau 10).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

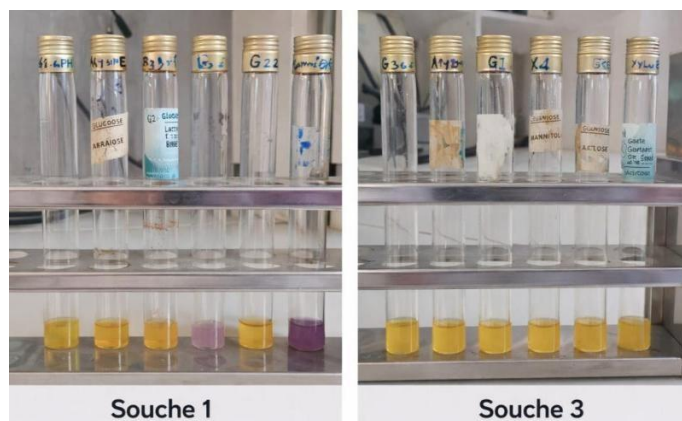


Figure 10 : La fermentation des sucres par la souche S1, S3

Tableau 10 : Profil fermentaire des souches isolées

	Glucose	Mannitol	Saccharose	Maltose	Lactose	Fructose	Galactose	Glycine
S1	+	-	+	+	+	+	+	-
S2	+	+	+	+	+	+	+	-
S3	+	+	+	+	+	+	+	-
S4	+	+	+	+	+	+	+	-
S5	+	+	+	+	+	+	+	-
S6	+	+	+	+	+	+	+	-

IV.4. Identification des souches lactiques isolées à partir du lait de vache cru

L'identification phénotypique des isolats repose sur une approche polyphasique (morphologique, physiologique et biochimique). L'ensemble des souches se caractérise par une morphologie de cocci, un caractère Gram positif et une absence d'activité catalasique. L'évaluation de leur croissance face aux variations de température, de pH et de salinité, combinée à l'étude de leurs profils fermentaires et de tests spécifiques (tels que la production d'acétoïne), a permis de différencier des genres présentés dans le tableau suivant :

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Tableau 11 : Récapitulatif de l'identification phénotypique des souches isolées

Souches	Morphologie cellulaire	Gram / Catalase	Caractéristiques physiologiques majeures	Mannitol	Espèce suspectée
S1	Cocci en paire et courte chaînettes	Gram (+) Catalase (-)	Mésophile, thermorésistante (60°C), halotolérance (NaCl 6.5 %), Homofermentaire, Acétoine (-)	Négative	<i>Enterococcus faecium</i>
S2	Cocci en paire et courte chaînettes	Gram (+) Catalase (-)	Mésophile, thermorésistante (60°C), halotolérance (NaCl 6.5 %), Homofermentaire, Acétoine (-)	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>
S3	Cocci en paire et courte chaînettes	Gram (+) Catalase (-)	Mésophile, thermorésistante (60°C), halotolérance (NaCl 6.5 %), Homofermentaire, Acétoine (-)	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>
S4	Cocci en paire et courte chaînettes	Gram (+) Catalase (-)	Mésophile, thermorésistante (60°C), halotolérance (NaCl 6.5 %), Homofermentaire, Acétoine (-)	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>
S5	Bacilles en chaînettes et en amas	Gram (+) Catalase (-)	Thermophile (40–50 °C), thermorésistante à 60 °C, homofermentaire, fermentaire	Positif	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S6	Bacilles en chaînettes et en amas	Gram (+) Catalase (-)	Thermophile (37–42 °C), homofermentaire.	Positif	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

IV.5. Résultats de la préparation des souches

La caractérisation macroscopique et microscopique des quatre souches présélectionnées (G1, G2, G5 et G6) confirme leur appartenance au groupe des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*. L'absence d'activité catalasique (catalase négative) associée à la morphologie bacillaire à Gram positif constitue le critère phénotypique de base pour ce genre taxonomique.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Les valeurs de densité optique mesurées à 600 nm comprises entre 0,632 et 0,731 indiquent que l'ensemble des cultures se trouvait dans une phase logarithmique idéale, garantissant une viabilité cellulaire élevée avant la phase de conservation au glycérol et l'extraction d'ADN pour l'identification moléculaire (PCR 16S rRNA).

IV.5.1. Profils électrophorétiques des produits de PCR

L'analyse électrophorétique des produits de (GTG)-PCR a permis d'obtenir différents profils de bandes pour les isolats de bactéries lactiques étudiés. Pour le groupe correspondant à *Lactiplantibacillus plantarum*, l'isolat G6 a présenté un profil comparable à celui de la souche de référence RS8, correspondant à *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014.

Une fraction spécifique de 610 pb a été observée. La figure suivante présente les profils électrophorétiques sur gel horizontal des produits PCR de bactéries lactiques autochtones, incluant les souches de référence et témoin (figure 11).

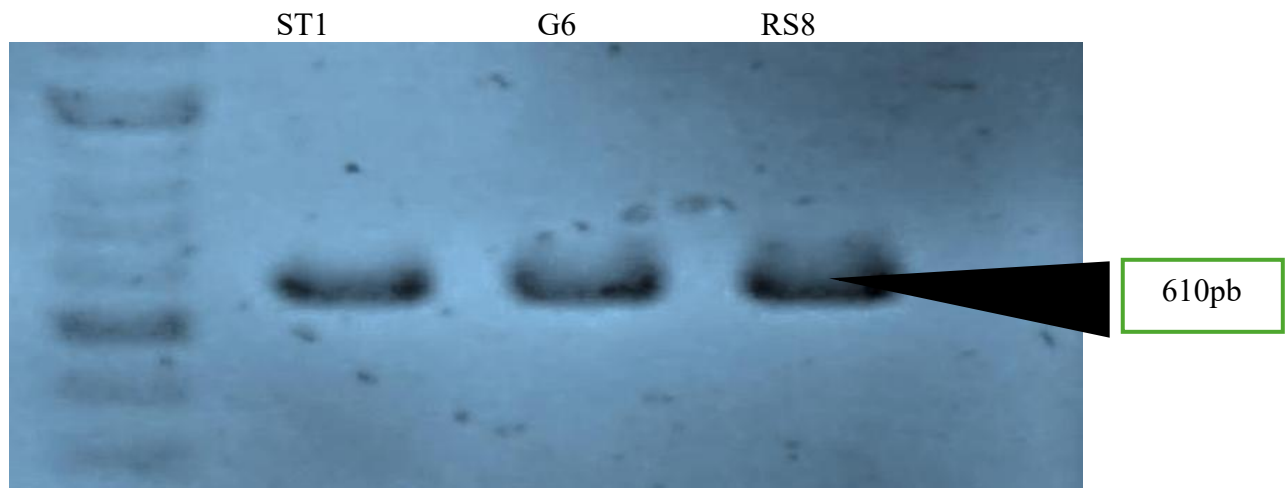


Figure 11: Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)₅-PCR des isolats de bactéries lactiques testées.

ST1 : souche témoin du labo ; G6 : souche isolée ; RS8 : souche de référence *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (fraction identique à 610pb)

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Pour le groupe correspondant à *Limosilactobacillus fermentum*, les isolats G1, G2 et G5 ont présenté des profils comparables à la souche de référence RS26, correspondant à *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 9338. Une fraction spécifique de 570 pb a été observée. La figure suivante présente un gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)5-PCR des isolats de bactéries lactiques. Les témoins du laboratoire ST1 et ST4 ont également présenté des profils associés respectivement aux groupes *L. plantarum* et *L. fermentum*.

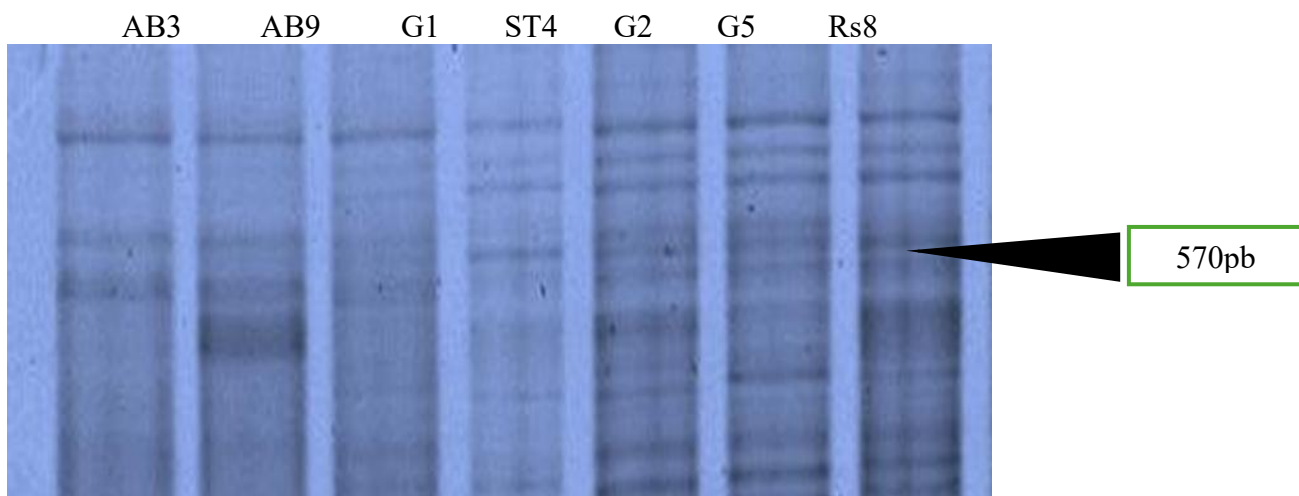


Figure 12 : Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)5-PCR des isolats de bactéries lactiques testées.

ST4 : souche témoin du labo ; AB3, AB9 ; G1 ; G2 ; G5 ; RS26 : souche de référence *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 9338 (fraction identique à 570pb).

IV.5.2. Identification génotypique des isolats et comparaison avec les souches de références

L'analyse des profils obtenus a permis l'identification génotypique de quatre isolats de

bactéries lactiques. La comparaison des profils électrophorétiques avec les souches de référence a permis de distinguer deux groupes principaux (tableau 12) :

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

- Le premier groupe correspond à *Limosilactobacillus fermentum*. Il comprend la souche de référence RS26 (ATCC 9338), le témoin ST4 ainsi que les isolats G1, G2 et G5. Ce groupe est caractérisé par une fraction spécifique de 570 pb.

- Le deuxième groupe correspond à *Lactiplantibacillus plantarum*. Il comprend la souche de référence RS8 (ATCC 8014), le témoin ST1 et l'isolat G6. Ce groupe est caractérisé par une fraction spécifique de 610 pb.

Tableau 12 : Résultats de l'identification des produits de la PCR (profils GTG5-PCR) du 22 au 27 Août 2026.

Code de l'isolat	ID des profils GTG5-PCR (Pearson corrélation)	% Conformité par comparaison à la base de données BLAST.NCBI et aux souches de références
G6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%
G1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100%
G2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100%
G5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100%

IV.5.3. Analyse du dendrogramme

Le dendrogramme obtenu à partir des profils électrophorétiques montre une séparation nette des isolats en deux groupes majeurs (figure 13).

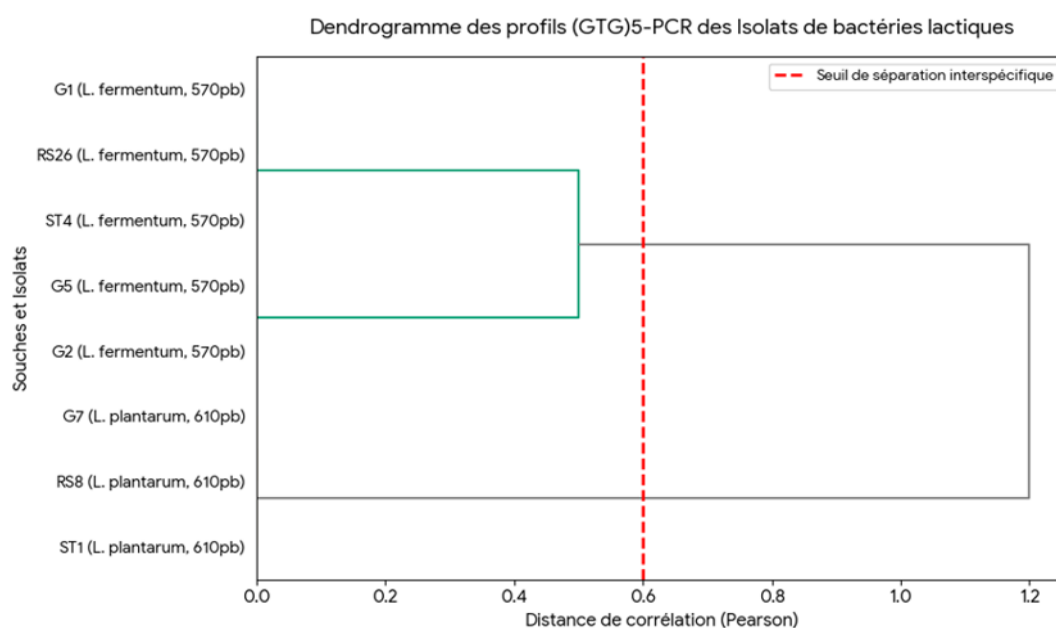


Figure 13 : Analyse d'inter-similarité génomique par rep-PCR (GTG)₅ d'isolats de bactéries lactiques sauvages et de leurs homologues de référence.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

D'après les résultats présentés dans la figure au-dessus, on observe que la structure des groupes générés en :

- Groupe 1 (570 pb) en vert : regroupe l'ensemble des souches de l'espèce *Limosilactobacillus fermentum* (RS26, G1, G2, G5, ST4). L'arborescence serrée montre une distance quasi nulle, traduisant l'homogénéité du profil à 570 pb.
- Groupe 2 (610 pb) en bleu : isole la souche de type *Lactiplantibacillus plantarum* (G6) ainsi que ses témoins associés (RS8, ST1), ancrés par l'amplicon unique à 610 pb.

Le dendrogramme structure les 04 isolats de bactéries lactiques en deux branches taxonomiques majeures, définies par leur profil de corrélation de Pearson et leurs amplicons spécifiques :

Groupe *Limosilactobacillus fermentum* (fraction spécifique à 570 pb) :

- RS26 (souche de référence ATCC 9338) : 100% de conformité ;
- G1 (isolat identifié) : 100% de conformité ;
- G2 (isolat identifié) : 100% de conformité ;
- G5 (isolat identifié) : 100% de conformité ;
- ST4 (souche témoin du laboratoire) : profil clonal.

Groupe *Lactiplantibacillus plantarum* (fraction spécifique à 610 pb) :

- RS8 (souche de référence ATCC 8014) : 100% de conformité ;
- G6 (isolat identifié) : 100% de conformité ;
- ST1 (souche témoin du laboratoire) : profil clonal.

L'arborescence est structurée en :

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

- Nœuds principaux : séparation stricte en deux branches distinctes. Aucune interconnexion ou profil hybride n'est observé entre les deux genres.
- Distance phylogénétique : marquée par l'écart de taille des fragments cibles (570 pb - 610 pb), agissant comme des marqueurs discriminants fiables.
- Topologie des feuilles : les isolats d'intérêt (G1, G2, G5 d'une part, et G6 d'autre part) se positionnent sur la même ligne terminale que leurs souches de référence respectives, confirmant visuellement leur identité taxonomique.

Le pouvoir discriminatoire de la (GTG)₅-PCR concerne l'utilisation de l'amorce universelle rep-PCR (GTG)₅, démontre ici une excellente résolution taxonomique au niveau de l'espèce. Elle a permis de séparer distinctement le genre hétérofermentaire *Limosilactobacillus* du genre homofermentaire facultatif *Lactiplantibacillus*.

Validation par souches de référence (ATCC), le regroupement à 100% de similitude (coefficient de Pearson) des isolats autochtones avec leurs souches de référence respectives (RS26 et RS8) valide l'identification phénotypique et génotypique préliminaire. La présence constante des fractions phares (570 pb pour *L. fermentum* et 610 pb pour *L. plantarum*) sert de code-barre moléculaire robuste pour votre banque de souches.

Homogénéité et clonalité du groupe *L. fermentum* regroupant les isolats G1, G2 et G5 partagent un profil strictement identique à la souche de référence et au témoin interne ST4. Cela suggère une potentielle relation clonale ou une origine écologique commune où cette sous-population est hautement dominante.

La fiabilité des données BLAST par rapport aux profils électrophorétiques montre une parfaite convergence entre les scores de 100% de conformité de la base de données BLAST.NCBI et l'arborescence du dendrogramme élimine tout biais d'identification. La

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

méthode est donc validée pour le criblage haut débit de ces flores d'intérêt technologique ou probiotique.

*** Pouvoir discriminatoire de la (GTG)-PCR**

***Pouvoir résolutif et spécificité taxonomique de la (GTG)_s-PCR**

L'empreinte génomique générée par l'amorce monocaténaire rep-PCR (GTG)_s confirme son excellente résolution taxonomique intra- et inter-générique. Au-delà d'une simple différenciation, cette approche a permis de tracer une frontière phylogénétique nette entre deux métabolismes distincts : le genre hétérofermentaire strict *Limosilactobacillus* et le genre homofermentaire facultatif *Lactiplantibacillus*. Ces résultats valident l'efficacité de la (GTG)_s-PCR comme outil de discrimination rapide, contournant les limites contractuelles et le coût des séquençages systématiques de l'ARNr 16S pour la distinction de genres microbiens proches.

*** Fiabilité inter-marqueurs et code-barres moléculaire**

L'alignement à 100 % de similitude (coefficient de Pearson) entre les isolats lactiques autochtones et les souches de référence (RS26 et RS8) apporte une double validation :

- Phénotypique : consolidation des caractères biochimiques préalablement observés.
- Génotypique : robustesse du criblage.

L'identification d'amplicons cibles systématiques à 570 pb pour *L. fermentum* et à 610 pb pour *L. plantarum* fait office de code-barre moléculaire standardisé. Cette signature discriminante constitue un atout majeur pour le référencement et la traçabilité au sein de votre banque de souches.

IV.5.4. Homogénéité clonale par rapport à la dynamique écosystémique

L'isogénie parfaite observée entre les isolats G1, G2, G5, la souche de référence et le témoin interne ST4 soulève une hypothèse écologique intéressante. Deux scénarios non exclusifs expliquent cette stricte homologie :

- Une relation clonale directe, impliquant la persistance d'un morphotype d'intérêt à travers le biotope d'échantillonnage.
- Une pression de sélection environnementale élevée, rendant cette sous-population ultra-dominante face aux fluctuations du milieu.

IV.5.5. Synergie bioinformatique et robustesse du screening haut débit

La convergence absolue (100 % d'identité) entre les données d'alignement local BLAST/NCBI et la topologie du dendrogramme élimine tout risque de biais technique ou d'identification. Cette parfaite corrélation macro-numérique (dendrogramme) et micro-séquentielle (BLAST) qualifie officiellement cette routine moléculaire pour le criblage à haut débit (High-Throughput Screening) de flores d'intérêt technologique, nutritionnel, probiotique ou de sécurité sanitaire.

IV.5.6. Dendrogramme de classification hiérarchique des isolats de bactéries lactiques

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

L'arbre phylogénétique (figure 14) montre clairement que les souches analysées se divisent en deux grands groupes distincts. Chaque groupe se caractérise par une taille de fragment d'ADN (amplicon) bien spécifique :

- Le groupe *Limosilactobacillus fermentum* (caractérisé par un fragment de 570 pb) : il rassemble la souche de référence RS26 (ATCC 9338), la souche témoin du laboratoire ST4 (qui présente le même profil clonal), ainsi que les isolats G1, G2 et G5, identifiés à 100 %.
- Le groupe *Lactiplantibacillus plantarum* (caractérisé par un fragment de 610 pb) : il regroupe la souche de référence RS8 (ATCC 8014), la souche témoin ST1 (profil clonal) et l'isolat G7, également identifié à 100 %.

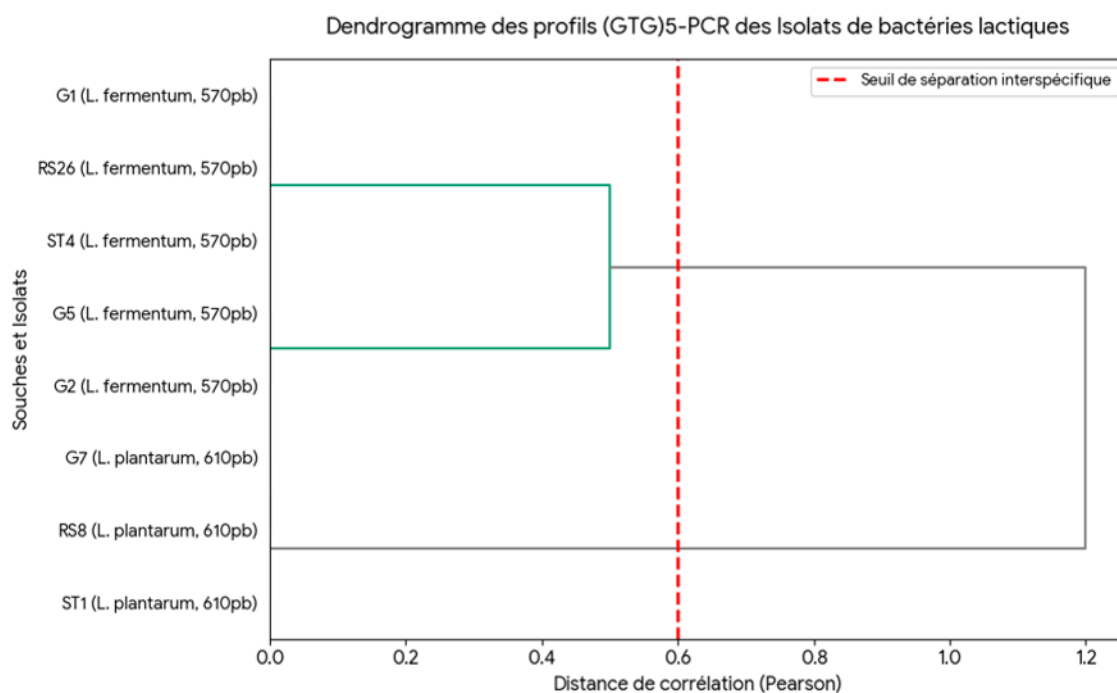


Figure 14 : Dendrogramme de classification hiérarchique des isolats de bactéries lactiques basé sur le profil de corrélation de Pearson.

VI.2. Discussion

L'objectif principal de cette étude était d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques (BL) présentes dans le lait de vache cru de la région de Mazagran (Mostaganem),

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

en combinant une caractérisation phénotypique basée sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques avec une identification génotypique des isolats d'intérêt. Cette approche complémentaire permet d'interpréter les caractéristiques des isolats et de confronter leur identification aux données de la littérature scientifique.

*** Qualité du lait et conditions d'échantillonnage**

Les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques du lait étudié, notamment sa couleur blanc-brun, son goût sucré et son pH compris entre 6,5 et 6,7, sont compatibles avec les caractéristiques générales d'un lait cru présentant une acidité relativement faible au moment du prélèvement. Le pH constitue notamment un paramètre important pour apprécier l'état de conservation du lait et l'évolution éventuelle de sa flore microbienne. Une valeur proche de la neutralité indique l'absence d'une acidification importante au moment de l'échantillonnage.

Les conditions d'échantillonnage utilisées, notamment le nettoyage des trayons, l'élimination des premiers jets et le transport des échantillons à basse température, sont importantes pour limiter les contaminations extérieures et préserver autant que possible la flore microbienne initialement présente dans le lait. La maîtrise de ces conditions est particulièrement importante lors de l'étude de la flore lactique autochtone, car les microorganismes présents dans le lait peuvent être influencés par les conditions de prélèvement, de transport et de conservation.

*** Isolement et caractérisation phénotypique des bactéries lactiques**

*** Caractéristiques macroscopiques et microscopiques**

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

L'utilisation du milieu MRS a permis l'isolement de colonies présentant des caractéristiques compatibles avec celles généralement observées chez les bactéries lactiques. Le milieu de De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) est couramment utilisé pour l'isolement et la culture des bactéries lactiques, notamment des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et apparentés (Tamime *et al.*, 2006 ; Tsegaye *et al.*, 2021). Les colonies obtenues dans notre étude étaient de petite taille, circulaires, bombées, lisses et de couleur beige. Ces caractères macroscopiques constituent une première orientation vers le groupe des bactéries lactiques, mais ne permettent pas à eux seuls une identification précise au niveau de l'espèce.

L'observation microscopique après coloration de Gram a montré deux morphologies principales : des cocci Gram positifs chez les souches S1 à S4 et des bacilles Gram positifs chez les souches S5 et S6. Cette diversité morphologique est compatible avec l'hétérogénéité du groupe des bactéries lactiques, qui comprend des bactéries de morphologie coccoïde et bacillaire (Axelsson, 2004 ; Tsegaye *et al.*, 2021). Ainsi, la morphologie observée a constitué une première étape dans l'orientation taxonomique des isolats, avant leur caractérisation physiologique et biochimique.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

* Test de catalase

Toutes les souches étudiées (S1 à S6) ont présenté une réaction négative au test de catalase. Ce résultat est cohérent avec les caractéristiques générales des bactéries lactiques, qui sont généralement Gram positives et catalase négatives (Axelsson, 2004 ; Tsegaye *et al.*, 2021). Des travaux portant sur l'isolement des bactéries lactiques à partir du lait et des produits laitiers utilisent également la réaction de Gram et le test de catalase comme critères de présélection des isolats (Tsegaye *et al.*, 2021).

L'absence d'activité catalasique, associée à la coloration de Gram positive et aux autres caractères observés, a donc contribué à confirmer le caractère présomptif des isolats comme bactéries lactiques. Cependant, le test de catalase ne permet pas à lui seul de déterminer l'espèce bactérienne.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

* Croissance en fonction de la température et de la salinité

Les résultats obtenus ont montré une différence physiologique entre les souches S1 à S4 et les souches S5 et S6. Les souches S1 à S4 ont présenté une croissance optimale à 37 °C, ainsi qu'une capacité à supporter un traitement à 60 °C pendant 30 minutes et une concentration de 6,5 % de NaCl. Cette aptitude à se développer dans des conditions relativement contraignantes est compatible avec certaines propriétés fréquemment rapportées chez les entérocoques.

Les entérocoques sont connus pour leur capacité à tolérer différentes conditions environnementales, notamment des concentrations relativement élevées en sel et différentes conditions physico-chimiques. Cette capacité d'adaptation explique en partie leur présence dans diverses matrices alimentaires et leur aptitude à coloniser différents environnements (Giraffa, 2002).

À l'inverse, les souches S5 et S6, présentant une morphologie bacillaire, ont montré une croissance optimale à 44 °C et n'ont pas présenté la même thermorésistance à 60 °C. L'ensemble de ces caractéristiques les différenciait des souches S1 à S4 et orientait leur identification vers le groupe des lactobacilles.

* Croissance en fonction du pH

Les souches étudiées ont montré une croissance à pH 5 et 6,5, alors qu'une inhibition a été observée à pH 9,5. Cette capacité à se développer dans un milieu acide constitue une caractéristique importante des bactéries lactiques. Les bactéries lactiques sont généralement adaptées aux environnements acides et leur métabolisme fermentaire conduit à la production d'acide lactique, ce qui peut contribuer à l'acidification des matrices alimentaires (Axelsson, 2004).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

L'acidotolérance représente également un avantage écologique pour ces microorganismes dans les aliments. La production d'acide lactique au cours de la fermentation peut modifier le pH du milieu et ainsi influencer la croissance d'autres microorganismes (Capozzi *et al.*, 2017).

Cette propriété présente également un intérêt technologique, notamment dans les produits laitiers fermentés, où l'acidification participe à la conservation et aux caractéristiques sensorielles du produit (Capozzi *et al.*, 2017 ; Pessione, 2012).

* Type fermentaire et test VP

L'absence de production visible de CO₂ dans les cloches de Durham chez les souches étudiées indique, dans les conditions expérimentales utilisées, un comportement fermentaire compatible avec un métabolisme homofermentaire. Chez les bactéries lactiques, la fermentation des glucides peut être de type homofermentaire ou hétérofermentaire selon l'espèce et les voies métaboliques utilisées (Axelsson, 2004).

Le test de Voges-Proskauer s'est également révélé négatif pour les souches étudiées. Ce résultat constitue un caractère biochimique supplémentaire utilisé dans la différenciation des isolats, mais son interprétation doit être considérée avec l'ensemble des autres tests réalisés plutôt qu'isolément.

* Profil de fermentation des sucres

L'étude du profil fermentaire a montré une capacité des différentes souches à utiliser plusieurs glucides, notamment le lactose, le galactose, le fructose, le maltose et le

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

saccharose. Cette aptitude est particulièrement intéressante dans le contexte du lait, qui constitue un environnement riche en lactose. L'utilisation de différents glucides constitue d'ailleurs l'un des critères couramment utilisés dans la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques (Tsegaye *et al.*, 2021).

Une variabilité a néanmoins été observée pour certains sucres. La souche S1, notamment, ne fermentait pas le mannitol, contrairement à plusieurs autres souches. Ce caractère a été pris en compte dans l'orientation de son identification vers *Enterococcus faecium*, alors que les souches S2, S3 et S4 ont été orientées vers *Enterococcus faecalis*.

Les profils physiologiques et biochimiques obtenus ont ainsi permis une première différenciation des isolats. Toutefois, les méthodes phénotypiques présentent certaines limites, car des espèces différentes peuvent parfois présenter des profils physiologiques ou biochimiques proches. Une confirmation moléculaire est donc particulièrement intéressante lorsqu'une identification taxonomique plus fiable est recherchée (Gevers *et al.*, 2001).

* Identification génotypique des isolats

Afin de compléter la caractérisation phénotypique, une identification génotypique a été réalisée sur certains isolats d'intérêt par analyse des profils électrophorétiques obtenus par (GTG)₅-PCR. Les résultats ont permis d'identifier l'isolat G7 comme *Lactiplantibacillus plantarum*, tandis que les isolats G1, G2 et G5 ont été associés à *Limosilactobacillus fermentum*. Selon les résultats fournis par le laboratoire, chacun de ces isolats présentait une conformité de 100 % avec les références correspondantes.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

L'isolat G7 a présenté un profil correspondant à celui de la souche de référence *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014, caractérisé dans les résultats obtenus par une fraction de 610 pb. Les isolats G1, G2 et G5 ont, quant à eux, présenté un profil correspondant à celui de *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 9338, avec une fraction de 570 pb.

La concordance entre les profils des isolats et ceux des souches de référence constitue un argument supplémentaire en faveur de leur identification. Le dendrogramme obtenu montre effectivement une séparation en deux groupes principaux : un groupe comprenant *L. fermentum* et les isolats G1, G2 et G5, et un second groupe comprenant *L. plantarum* et G7.

***Comparaison avec les travaux antérieurs sur le (GTG)₅-PCR**

Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de Gevers et al. (2001), qui ont étudié l'applicabilité de la technique rep-PCR pour l'identification des espèces de *Lactobacillus*. Les auteurs ont montré que le fingerprinting obtenu par (GTG)₅-PCR permettait de différencier un large éventail de lactobacilles, couvrant 26 espèces ou sous-espèces, avec une résolution pouvant atteindre potentiellement le niveau de la souche. La méthode a également été décrite comme rapide et reproductible pour la caractérisation et le typage des bactéries lactiques d'intérêt alimentaire (Gevers *et al.*, 2001).

Dans notre étude, la séparation des profils correspondant à *Lactiplantibacillus plantarum* et *Limosilactobacillus fermentum* va dans le même sens, puisque les profils électrophorétiques ont permis de distinguer clairement les deux groupes. La position des isolats d'intérêt sur le dendrogramme avec leurs références respectives renforce également cette observation.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

D'autres travaux ont également montré l'intérêt du (GTG)₅-PCR pour étudier la diversité génétique des bactéries lactiques. Benítez-Cabello et al. (2019) ont utilisé une approche basée sur le GTG₅-rep-PCR pour caractériser des bactéries lactiques isolées de biofilms d'olives de table. Les auteurs ont étudié 554 isolats et obtenu 79 génotypes différents par rep-PCR utilisant l'amorce GTG₅. Certains génotypes ont ensuite été identifiés par PCR multiplex du gène recA et séquençage du gène codant l'ARNr 16S, notamment comme *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus plantarum* (Benítez-Cabello et al., 2019).

Ces observations soutiennent l'utilisation du (GTG)₅-PCR comme outil de caractérisation des bactéries lactiques, notamment lorsque l'objectif est de comparer les profils génétiques d'un ensemble d'isolats.

* Comparaison avec les bactéries lactiques isolées des produits laitiers algériens

La présence de *Lactiplantibacillus plantarum* et de *Limosilactobacillus fermentum* dans nos résultats peut également être rapprochée de travaux réalisés sur des matrices alimentaires algériennes.

Une étude récente consacrée au fromage traditionnel algérien El-Klila a caractérisé 26 isolats de bactéries lactiques en combinant une caractérisation phénotypique avec plusieurs approches génotypiques, notamment le rep-PCR fingerprinting, le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le gène recA. Les auteurs ont identifié principalement *Lactiplantibacillus plantarum* (73 %), suivi de *Lacticaseibacillus paracasei* (23 %) et de *Limosilactobacillus fermentum* (4 %) (Belarbi et al., 2026).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

La détection de *L. plantarum* dans notre étude est donc cohérente avec les observations rapportées dans ce produit laitier traditionnel algérien. La présence de *L. fermentum* constitue également un point de concordance entre les deux études. Toutefois, les proportions observées ne doivent pas être directement comparées, puisque les matrices, le nombre d'isolats, les conditions d'isolement et les stratégies d'identification ne sont pas identiques. Cette comparaison montre néanmoins que les espèces identifiées dans notre étude font partie des bactéries lactiques susceptibles d'être retrouvées dans les environnements alimentaires et laitiers algériens (Belarbi *et al.*, 2026).

* Homogénéité génétique des isolats G1, G2 et G5

Un résultat particulièrement intéressant concerne les isolats G1, G2 et G5. Ces trois isolats ont présenté des profils très similaires et se sont regroupés avec la souche de référence *L. fermentum* ATCC 9338 et le témoin interne ST4 dans le même groupe du dendrogramme. La documentation fournie indique une distance très faible entre ces profils.

Cette forte similitude suggère une proximité génétique importante entre G1, G2 et G5. Elle pourrait traduire une origine écologique commune ou la présence de souches génétiquement proches dans le lait étudié.

Cependant, il convient d'éviter d'affirmer que ces trois isolats sont obligatoirement clonaux sur la seule base du profil obtenu. Gevers *et al.* (2001) ont montré que le (GTG)₅-PCR pouvait fournir une discrimination jusqu'au niveau potentiel de la souche, mais l'interprétation d'une relation clonale nécessite une résolution et une validation adaptées. Ainsi, la formulation « forte proximité génétique » est plus appropriée scientifiquement que l'affirmation d'une clonalité certaine (Gevers *et al.*, 2001).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

***Confrontation entre les résultats phénotypiques et génotypiques**

La combinaison des deux approches utilisées dans cette étude présente un intérêt particulier. La caractérisation phénotypique a permis d'orienter les isolats selon leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, tandis que l'approche génotypique a permis d'apporter des informations supplémentaires sur certains isolats d'intérêt.

Les résultats moléculaires ont notamment permis d'associer G7 à *Lactiplantibacillus plantarum* et G1, G2 et G5 à *Limosilactobacillus fermentum*. Les profils électrophorétiques obtenus ont également montré une organisation cohérente des isolats dans le dendrogramme, avec une séparation des deux groupes correspondant aux deux espèces de référence.

Cette complémentarité montre l'intérêt d'associer les méthodes classiques aux méthodes moléculaires. Les caractères phénotypiques restent importants pour une première caractérisation des isolats, tandis que les approches moléculaires peuvent apporter une résolution supplémentaire pour l'identification et la comparaison des isolats (Gevers *et al.*, 2001 ; Tsegaye *et al.*, 2021).

L'étude réalisée sur El-Klila illustre également l'intérêt de combiner plusieurs approches moléculaires. Dans cette étude, le rep-PCR fingerprinting a été associé au séquençage des gènes 16S rRNA et recA, permettant une identification plus approfondie des isolats (Belarbi *et al.*, 2026).

***Intérêt biotechnologique des bactéries lactiques isolées**

Les caractéristiques observées chez les isolats étudiés présentent un intérêt potentiel dans le domaine alimentaire. Leur capacité à se développer dans des conditions de pH

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

relativement acides et leur aptitude à fermenter différents sucres, notamment le lactose, sont particulièrement intéressantes dans le contexte des produits laitiers. Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour leurs propriétés fermentaires, acidifiantes et technologiques (Capozzi *et al.*, 2017 ; Mokoena, 2017).

Concernant les lactobacilles, *Lactiplantibacillus plantarum* est une espèce largement retrouvée dans différents aliments fermentés et produits laitiers et possède une grande capacité d'adaptation à différents environnements alimentaires (Behera *et al.*, 2018). Des travaux récents soulignent également la présence de *L. plantarum* et de *Limosilactobacillus fermentum* dans différentes matrices alimentaires et leur intérêt potentiel pour les applications fermentaires (Zapašnik *et al.*, 2022).

Les entérocoques identifiés phénotypiquement chez les souches S1 à S4 présentent également des propriétés d'adaptation à des conditions environnementales contraignantes. Toutefois, leur utilisation technologique doit être envisagée avec prudence, car certaines espèces ou certaines souches d'*Enterococcus* peuvent présenter des caractéristiques indésirables sur le plan sanitaire, notamment en raison de facteurs de virulence ou de résistances aux antimicrobiens (Giraffa, 2002).

* Limites et perspectives

Malgré l'intérêt des résultats obtenus, certaines limites doivent être prises en considération. La caractérisation phénotypique seule ne permet pas toujours de distinguer avec certitude des espèces présentant des caractères proches. Des travaux d'isolement et d'identification des bactéries lactiques à partir du lait ont également montré l'intérêt de combiner les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques avec des méthodes moléculaires pour parvenir à une identification plus précise (Tsegaye *et al.*, 2021).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

De même, le fingerprinting par rep-PCR/(GTG)₅-PCR est particulièrement utile pour comparer les profils génétiques, mais une confirmation par d'autres approches moléculaires peut être souhaitable lorsque l'identification taxonomique définitive est recherchée.

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et l'utilisation de marqueurs complémentaires, comme *recA*, constituent notamment des approches utilisées dans des études de caractérisation des bactéries lactiques (**Benítez-Cabello *et al.*, 2019 ; Belarbi *et al.*, 2026**).

À cet égard, le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, l'utilisation de marqueurs moléculaires complémentaires ou encore des approches de typage à plus haute résolution pourraient être envisagés dans des travaux ultérieurs. Ces méthodes permettraient également d'approfondir l'étude de la diversité génétique des isolats et de déterminer plus précisément les relations entre les souches G1, G2 et G5.

Il serait également intéressant d'évaluer les propriétés technologiques des isolats identifiés, notamment leur capacité acidifiante, leur production de composés antimicrobiens, leur tolérance aux conditions rencontrées lors des fermentations et, lorsque cela est pertinent, leurs éventuelles propriétés probiotiques. De telles évaluations ont notamment été réalisées sur des isolats de bactéries lactiques provenant de produits alimentaires, en étudiant leur tolérance aux conditions acides, leur production d'exopolysaccharides et leurs activités antimicrobiennes (**Benítez-Cabello *et al.*, 2019 ; Belarbi *et al.*, 2026**).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler, de caractériser et d'identifier la flore lactique issue du lait de vache cru de la région de Mazagran (Mostaganem), en associant une caractérisation phénotypique à une identification génotypique par (GTG)₅-PCR.

Les analyses physico-chimiques initiales du lait ont révélé des paramètres conformes à un lait cru frais et de bonne qualité (pH compris entre 6,5 et 6,7), confirmant l'efficacité des conditions d'échantillonnage pour préserver la microflore native.

Sur le plan phénotypique, l'isolement sur milieu MRS a permis de sélectionner six souches représentatives (S1 à S6), toutes Gram positives et catalase négatives :

- * Les souches de S1 à S4 présentent des critères physiologiques orientant leur appartenance vers le genre *Enterococcus* (avec des variations biochimiques distinguant *Enterococcus faecium* pour S1 et *Enterococcus faecalis* pour S2, S3 et S4).

- * Les souches S5 et S6 se caractérisent par une morphologie bacillaire, une croissance optimale à 44°C et un comportement homofermentaire, orientant leur profil vers le groupe des lactobacilles.

Sur le plan génotypique, l'empreinte génétique obtenue par (GTG)₅-PCR a confirmé la haute résolution de cet outil moléculaire pour la clarification taxonomique des lactobacilles d'intérêt :

- * L'isolat G6 a été identifié avec précision comme *Lactiplantibacillus plantarum* (correspondance exacte avec la souche de référence ATCC 8014, fraction à 610 pb).

les isolats G1, G2 et G5. Ces trois isolats ont présenté des profils très similaires et se sont regroupés avec la souche de référence *L. fermentum* ATCC 9338 et le témoin interne ST4

Conclusion

dans le même groupe du dendrogramme. La documentation fournie indique une distance très faible entre ces profils.

Ainsi, la combinaison des approches phénotypique et génotypique constitue une stratégie pertinente pour mieux caractériser la flore lactique du lait cru. Des études complémentaires reposant notamment sur le séquençage et sur l'évaluation des propriétés technologiques et fonctionnelles des souches permettraient de mieux déterminer leur potentiel d'utilisation dans les produits laitiers fermentés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adria Frangne, R. (1988). Dictionnaire des denrées alimentaires : Biologie, chimie, technologie. Éditions Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Alais, C. (1984). Science du lait : principes de technique laitière. 4^{ème} édition, Editions Sepaic, Paris.

Alloush, M. (2018). Contrôle et analyse microbiologique du lait et des produits laitiers. Publications Universitaires, Damas.

Amiot, J., et al. (2002). Science et technologie du lait : Du lait à la transformation. Presses Internationales Polytechnique, Montréal.

Ammour, S., et al. (2021). Microbial diversity and technological properties of indigenous lactic acid bacteria isolated from raw milk. International Journal of Food Microbiology, 345, 109123.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria : Classification and physiology. In : Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects (3rd ed.). Marcel Dekker, New York, USA.

B

Bacha, F. (2014). Qualité microbiologique et hygiénique du lait cru en Algérie : Risques toxicologiques et mesures préventives. Thèse de Doctorat, Université de Constantine, Algérie.

Badis, A. (2004). Contribution à l'étude des bactéries lactiques isolées de lait cru de chèvre de deux races locales : caractérisation phénotypique, métabolique et technologique. Thèse de Magister en Microbiologie, Université d'Oran, Algérie.

Badis, A., et al. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of two Algerian breeds. Food Microbiology, 22(6), 573-583.

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties : An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. BioMed Research International, 2018, 9361614.

Références Bibliographiques

Belarbi, F., Nielsen, D. S., Cieplak, T., Maghnia, D., Medouakh, L., Loumani, A., & Bensoltane, A. (2026). Identification, phenotypic characterization, and assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the Algerian traditional cheese “El-Klila”. *FEMS Microbiology Letters*, 373, fnag039.

Benaissa, M., et al. (2022). Limitations of phenotypic methods and necessity of molecular tools in lactic acid bacteria identification. *Journal of Microbiological Methods*, 192, 106385.

Benítez-Cabello, A., Calero-Delgado, B., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2019 / 2021). Biodiversity and multifunctional features of lactic acid bacteria isolated from table olive biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 836.

Benamrouche, N. (2014). Caractérisation phénotypique, génotypique et potentiel technologique des bactéries lactiques isolées du lait cru et de produits laitiers traditionnels. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université d’Alger, Algérie.

Benmouna, M., et al. (2025). Biopreservation and antimicrobial metabolites produced by dairy lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 105(2), 14.

Bennett, R. W., et al. (2003). Toxigenic bacteria and infectious agents in raw milk supplies. *Journal of Food Protection*, 66(4), 712-719.

Bonnefoy, J., et al. (2002). Les coliformes dans la filière laitière : Indicateurs d’hygiène et de qualité. *Le Lait*, 82(3), 305-315.

Brulé, G., et al. (2012). Les constituants minéraux et protéiques du lait : Interactions et états physico-chimiques. Éditions Lavoisier, Paris.

C

Capozzi, V., Spano, G., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial resources for food fermentation. *Microorganisms*, 5(2), 35.

Corrieu, G., & Luquet, F. M. (2008). Bactéries lactiques et probiotiques. Éditions Lavoisier, Paris, France.

D

Références Bibliographiques

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Volume 3 : The Firmicutes*. Springer, New York, USA.

Desjeux, P. (1993). Digestion et métabolisme des lipides du lait chez l'homme. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 28(4), 215-220.

F

Fredot, M. (2005). *Connaissance des aliments : Les produits laitiers*. Éditions Tec & Doc, Paris.

G

Garvie, E. I. (1986). The genus *Leuconostoc* and its differentiation from other lactic acid bacteria. *Methods in Microbiology*, 18, 51-73.

Gaucher, I., et al. (2008). Variations du pH et de la composition du lait au cours de la lactation. *Dairy Science & Technology*, 88(4), 405-422.

Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 31–36.

Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163–171.

Goursaud, J. (1985). Les enzymes du lait : Rôle et importance en technologie laitière. *Le Lait*, 65(647), 185-202.

Guiraud, J. P. (1998 & 2012). *Microbiologie alimentaire*. Éditions Dunod, Paris, France.

H

Hadji, K., et al. (2023). Lactic acid bacteria as natural biopreservatives in traditional foods. *Food Biotechnology*, 37(1), 45-68.

Hermier, J., et al. (1992). La microflore originelle du lait cru de vache. *Lait*, 72(2), 133-155.

Références Bibliographiques

Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. (2014). Lactic Acidobacteria : Biodiversity and Taxonomy. John Wiley & Sons.

J

Jaquet, J., & Veisseyre, R. (1987). Flore d'altération et pathogène des produits laitiers. La Maison Agricole Rustique, Paris.

Jeantet, R., et al. (2008). The science of dairy products : Lactic carbohydrates and physical properties. Lavoisier, Paris.

k

Kihal, M. (1996). Contribution à l'étude des bactéries lactiques thermophiles isolées de laits de chèvre et de brebis de la région de l'Ouest algérien. Thèse de Doctorat, Université d'Oran, Algérie.

L

Larpent, J. P. (1991 & 1997). Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire et flores bactériennes. Éditions Tec & Doc, Paris.

Leclerc, H., et al. (1977). Méthodes de conservation à court et long terme des souches microbiennes d'intérêt industriel. Annales de Microbiologie, 128(B), 141-156.

Lpointe, G., & Vignola, C. L. (2002). Vitamines liposolubles et hydrosolubles dans le lait de vache. Presses Internationales Polytechnique, Montréal.

Luquet, F. M., & Bonjean-Linczowski, C. (1997). Le Lait et les Produits Laitiers : Vache, Chèvre et Brebis. Lavoisier Tec & Doc, Paris.

M

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Marconi, E., et al. (2000). Phenotypic methods in modern bacterial taxonomy. Journal of Applied Microbiology, 89(3), 390-401.

Références Bibliographiques

Mathieu, J. (1998). Les glucides mineurs et azotés du lait de mammifères. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 115(5), 24-29.

Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernandez, M., Munoz, R., Pérez, P., & Ramirez, M. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In : *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : Novel Applications*. Wiley-Blackwell, pp. 83–102.

Mezaini, A., et al. (2024). Biodiversity and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk in Algeria. *Journal of Dairy Research*, 91(1), 78-85.

Mokoena, M. P. (2017 & 2021). Lactic acid bacteria and their bacteriocins : Classification, biosynthesis and applications. *Molecules*, 22(8), 1255.

Moulay, M., et al. (2006). Techniques de cryoconservation des bactéries lactiques autochtones. *Revue de Microbiologie Industrielle*, 14(2), 89-95.

P

Park, Y. W. (2009). Bioactive components in goat milk : Biological, functional and therapeutic significance. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5782–5795.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185.

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity : Lights and shadows. *BioMed Research International*, 2012, 519829.

Petransxiene, M., & Lapied, J. (1981). Les coliformes et la contamination fécale des laits crus. *Revue Laitière Française*, 401, 35-41.

S

Saidi, B., et al. (2002). Profils fermentaires et caractérisation biochimique des bactéries lactiques isolées de laits traditionnels. *Sciences des Aliments*, 22(3), 291-304.

Schleifer, K. H. (2009). Systematics of lactic acid bacteria. In : De Vos, P., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 3). Springer-Verlag, New York, pp. 19–32.

Références Bibliographiques

Singh, R., et al. (2021). Impact of pasteurization on vitamin and mineral profiles of bovine milk. *Food Chemistry*, 342, 128320.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.

T

Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2006). *Tamime and Robinson's Yoghurt : Science and Technology* (3rd ed.). Woodhead Publishing.

Tapernoux, A., & Vuillaume, R. (1934). La viscosité du lait et ses facteurs de variation. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 110, 321-335.

Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal*, 2021, 4697445.

Tenea, G. N., & Boudebbouze, S. (2023). Functional and probiotic attributes of autochthonous lactic strains isolated from dairy niches. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(4), 890-905.

Teuber, M., & Geis, A. (2006). The genus *Lactococcus* and related species. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 173-215.

Thieulin, G., & Vullaume, R. (1967). *Le Lait : Propriétés, altérations et contrôles*. Éditions Le François, Paris.

Tsegaye, Z., et al. (2021). Polyphasic characterization of lactic acid bacteria from raw milk. *Heliyon*, 7(5), e07012.

Turkmen, N. (2017). Minéraux et composition biochimique comparée du lait de vache et du lait humain. *International Dairy Journal*, 68, 12–18.

V

Veisseyre, R. (1975). *Technologie du lait : Le lait, les produits laitiers*. 3^{ème} édition, La Maison Agricole Rustique, Paris.

Références Bibliographiques

Vera-Peña, M., & Rodriguez, J. (2023). Physiological screening methods for *Enterococcus* and *Streptococcus* differentiation. *Journal of Microbiological Methods*, 204, 106650.

Vierling, E. (2003). *Aliments et boissons : Filières et produits*. Éditions Doin, Paris.

Vignola, C. L. (2002). *Science et technologie du lait : Transformation du lait*. Presses Internationales Polytechnique, Montréal, Canada.

W

Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2019). *Prescott's Microbiology* (11th ed.). McGraw-Hill Education.

Wood, B. J. B. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Vol. 1 & 2, Blackie Academic & Professional, London, UK.

Z

Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria : A review of their production, purification, and suitability for applications. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 211–224.

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11(9), 1283.

ANNEXES

Annexes

Annexe A :

- Résultats Supplémentaires et Données Brutes (RS).
- Les données phénotypiques, les profils de croissance et les caractéristiques morphologiques des souches isolées se présentent comme suit :
- RS 1 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-5}) : Présente une bonne croissance sur milieu MRS (+++) et modérée sur M17 (++). Le test de la catalase est négatif (-), la coloration de Gram est positive (+) avec une morphologie mixte de bacilles et de coques.
- RS 2 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-5}) : Affiche une forte croissance sur MRS et M17 (+++). Catalase négative (-), Gram positif (+) sous forme de coques en chaînes.
- RS 3 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-6}) : Croissance modérée sur MRS (++) et forte sur M17 (+++). Catalase négative (-), Gram positif (+) avec des coques isolées.
- RS 4 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-6}) : Croissance intense sur MRS (+++) et modérée sur M17 (++). Catalase négative (-), Gram positif (+) caractérisé par des bacilles courts.
- RS 5 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-5}) : Faible croissance sur les deux milieux MRS et M17 (+). Catalase négative (-), Gram positif (+) sous forme de coques.
- RS 6 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-6}) : Excellente croissance sur les milieux MRS et M17 (+++). Catalase négative (-), Gram positif (+) de morphologie bacillaire.
- RS 7 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-5}) : Croissance modérée sur MRS (++) et faible sur M17 (+). Catalase négative (-), Gram positif (+) avec des coques groupées.
- RS 8 (Isolé du lait cru à la dilution 10^{-6}) : Croissance maximale sur les deux milieux (+++). Catalase négative (-), Gram positif (+) représentant des bacilles hétérofermentaires.

Annexe B : Souches Témoins et Profils de Référence (ST)

- Annexe B.1 : ST 1 (Souche Témoin 1 – Profil de référence phénotypique et biochimique)
- Espèce de référence : *Lactiplantibacillus plantarum* (souche type ATCC 8014).
- Profil fermentaire : Fermentation positive du glucose, du lactose, du fructose et du mannitol. Absence de production de gaz (voie homofermentaire).
- Tolérance : Croissance optimale à 37°C, tolérance au NaCl à 6.5%.
- Annexe B.2 : ST 4 (Souche Témoin 4 – Profil de référence génotypique)
- Espèce de référence : *Limosilactobacillus fermentum* (souche type ATCC 9338).
- Profil moléculaire : Profil d'empreinte génomique obtenu par la technique de PCR avec l'amorce (GTG)₅, présentant une bande caractéristique standard de référence utilisée pour la comparaison des profils dendrogrammiques des isolats.