

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

**FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

Étude des bactéries lactiques productrices des bactériocines dans les produits laitiers

Présenté par : **Melle Djebaili Kaouther**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury :	Dr.Kanoun Khedoudja	(M.C.A/UDL)
Examineur :	Dr.Chama Zouaouia	(M.C.B/UDL)
Examineur :	Dr.Benabbou Amina	(M.C.B/UDL)
Promoteur :	Dr.Ouramdane Refka	(M.C.B/UDL)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse mes plus vifs remerciements à M^{me} OURAMDANE REFKA maître de conférences B à l'Université de SIDI BEL ABBES, pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Je suis particulièrement reconnaissante à M^{me} KANOUN. Maître de conférences d'avoir accepté de juger mon travail en tant que présidente ainsi que MME CHAMA. Z maître de conférences B, et M^{me} BENABBOU AMIRA maître de conférences B de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.

Mes très spéciaux remerciements reviennent à ma famille et mes amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

KANTHAR

Dédicace

Je dédie ce travail à

*Mon cher papa Mr. Djebaili Belkacem que ton âme repose en paix
Tu étais un pilier solide pour ma personne et mon parcours, merci pour ton
amour.*

*A ma mère Mme. Nssighaoui Nadia que ce travail soit pour toi le
Témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et*

Toutes ces années de compréhension, je t'aime maman

A mes chères sœurs HADJER et RAYANE,

Que dieu les protège et les garde pour moi.

Je leurs souhaite la réussite et la joie.

A mes chers frères MOHAMED, REDA,

Je leurs souhaite une vie pleine de bonheur.

A ma très chère amie que j'aime très fort NOR EL HOUDA

Je la souhaite un bon Avenir et la joie.

A mon cher ami Wally merci pour ton support.

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques la propriété de produire des substances antimicrobiennes et sont utilisées dans la fermentation et la bio-préservation des aliments.

L'étude de souches bactériennes lactiques productrices des bactériocines a été entreprise à partir du lait cru de chèvre, l'isolement des bactéries lactiques nous a permis d'obtenir 6 souches (Gram positif et catalase négative) et sont par la suite purifiées et conservées. L'étude de l'ensemble des caractéristiques phénotypiques, biochimiques et physiologiques (test de type fermentaire, test de croissance à pH 3, pH 9, pH 7, pH 4.5, test de croissance à différentes températures, le test de la thermo-résistance et test d'effet d'oxygène ont permis d'identifier les critères des bactéries lactiques isolées. Les 6 souches ont été testées pour leur pouvoir inhibiteur à l'encontre de trois souches pathogènes référencées qui sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, par la méthode de diffusion en puits et la méthode de disque. L'interaction de nos souches lactiques et les bactéries pathogènes a donné des résultats positifs pour toutes les souches observées par la formation des zones d'inhibition.

La souche 4, a été retenue pour sa forte activité bactéricide, notamment vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode de disque et vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 par méthode des puits.

Mots clés : bactéries lactiques, bactériocines, activité bactéricide, lait cru de chèvre, interactions.

Abstract

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our diet, and have long been known to produce antimicrobial substances and are used in the fermentation and biopreservation of food.

The study of lactic bacteria strains producing bacteriocins was undertaken from raw goat milk. The isolation of lactic bacteria from raw goat milk allowed us to obtain 6 strains (Gram positive and catalase negative), which were purified and preserved.

The study of all the phenotypic, biochemical and physiological characteristics (fermentative type test, growth test at pH 3, pH 9, pH 7, pH 4.5, growth test at different temperatures: 30°C, 45°C, 37°C and the thermoresistance test, and the oxygen effect test) allowed us to identify the criteria of the isolated lactic bacteria

The 6 strains were tested for their inhibitory povere against three referenced pathogenic strains which are: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, by the method of diffusion in wells and the method of disk . The interaction of our lactic strains and the pathogenic bacteria gave positive results for all the strains, observed by creating zones of inhibition.

Strain 4 was selected for its strong bactericidal activity, in particular against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by the disk method and against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 by the well method.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocins, antibacterial activity, raw goat milk, interactions.

المخلص

تعد بكتيريا حمض اللاكتيك جزءاً طبيعياً من بيئتنا ونظامنا الغذائي ، وقد تم التعرف على بكتيريا حمض اللاكتيك منذ فترة طويلة على أنها تمتلك خاصية إنتاج مواد مضادة للميكروبات وتستخدم في تخمير الطعام وحفظه بيولوجياً.

أجريت دراسة السلالات البكتيرية لحمض اللاكتيك المنتجة للبكتريوسينات باستخدام حليب الماعز الخام.سمح عزل بكتيريا حمض اللاكتيك عن حليب الماعز الخام بالحصول على 6 سلالات (موجبة الجرام وسلبية الكاتلاز) تم تنقيتها وحفظها و دراسة جميع الخصائص المظهرية والكيميائية الحيوية والفسيلوجية (اختبار نوع التخمر ، اختبار النمو عند درجة الحموضة 3 ،درجة الحموضة 9 ، درجة الحموضة 7 ، درجة الحموضة 4.5 ، اختبار النمو عند درجات حرارة مختلفة : 30 درجة مئوية ، 45 درجة مئوية ، 37 درجة مئوية و اختبار المقاومة الحرارية واختبار تأثير الأوكسجين) لتحديد معايير بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة.تم اختبار 6 سلالات من أجل قوة المقاومة ضد ثلاث سلالات مسببة للأمراض المشار إليها وهي: *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ، عن طريق طريقة الانتشار بالثقوب وطريقة القرص.

التفاعل بين سلالات حمض اللبنيك لدينا ومسببات الأمراض أعطت البكتيريا نتائج إيجابية لجميع السلالات ، والتي لوحظت من خلال تكوين مناطق التثبيط و المقاومة .

تم اختيار السلالة 4 لنشاطها القوي المبيد للجراثيم، خاصة ضد *Escherichia coli* ATCC 25922 ، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بطريقة القرص وضد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 بطريقة الانتشار عن طريق الثقوب.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا حمض اللاكتيك ، بكتريوسينات ، نشاط مضاد للبكتيريا ، حليب ماعز خام ، تفاعلات.

Liste des abréviations

FAO: Food and Agriculture Organization.

Zi : Zone d'inhibition.

CO₂ : Dioxyde de Carbone

kDa : Kilo-Dalton

µg : microgramme

µl: microlitre

Lb: Lactobacillus.

µL : Microlitre.

°C : Degré Celsius

h : Heure

HCl: Chlorure d'hydrogène

mm : Millimètre

min: Minute

pH : Potentiel d'hydrogène

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

NAD⁺/ NADH, H⁺: Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique. ,

S. aureus : Staphylococcus aureus.

LAB : lactic acid bacteria (bactérie lactique)

MRS: milieu de Man, Rogosa and Sharpe.

ml: millilitre ;

Ps.aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa , **E .coli:** Escherichia Coli

Liste des figures

Figure 1 : chèvre (Capra de couleur noire) à Sidi bel Abbes.....	08
Figure 2 : représente l'évolution de la production de lait de chèvre en Algérie pendant les quinze dernières années (FAO, 2015).....	08
Figure 3 : Composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).....	11
Figure 4 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot et al., 2002).....	12
Figure 5 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres Aerococcus, Bacillus, Listeria et Staphylococcus (Axelsson, 2004).....	21
Figure 6 : observation microscopique à transmission (×1000) référence électronique	22
Figure 7 : Morphologie en microscopie électronique d' <i>Lactococcus lactis</i>	23
Figure 8 : Morphologie en microscopie électronique d' <i>Enterococcus lactis</i> ss.....	23
Figure 9 : Morphologie en microscopie électronique de <i>Leuconostoc ssp</i>	24
Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique de <i>bifidobactérium longum ssp</i>	25
Figure 11 : Morphologie en microscopie électronique de <i>Pediococcus ssp</i>	25
Figure 12 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, s. d. 2011).....	27
Figure 13 : Séquence et structure de l'antibiotique de type A (Nisine)(C. Dortu et Thonart 2009).....	36
Figure 14 : Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.....	37
Figure 15 : Classification universelle des bactériocines (Taale et al. 2016).....	39
Figure 16 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. (Taale et al. 2016).....	42

Figure 17 : le mécanisme d'action de bactériocines (Cotter et al., 2005).....	43
Figure 18 : présentation de la race chèvre (Capra de couleur noire)	46
Figure 19 : La méthode de prélèvement d'échantillon à partir du lait de chèvre (Capra) de la région de Sidi bel Abbés.....	47
Figure 20 : la préparation des dilutions décimales	49
Figure 21 : solidification de milieu MRS gélose inoculés dans les boites de pétri.....	50
Figure 22 : Enrichissement des bactéries lactique isolées et incubé dans une jarre.....	51
Figure 23 : schéma de la préparation et l'ensemencement des dilutions décimales.....	52
Figure 24 : schéma représentative des étapes d'isolement et la purification des bactéries lactiques.....	53
Figure 25 : les étapes de la coloration de Gram.....	55
Figure 26 : Réalisation de test de catalase.....	56
Figure 27 : Réalisation de test de type fermentaire des bactéries lactique.....	57
Figure 28 : Réalisation de test de Mannitol-mobilité sur les bactéries lactiques.....	59
Figure 29 : digramme explicatif les étapes de la méthode des puits.....	63
Figure 30 : préparation et réalisation de test des disques.....	64
Figure 31 : aspect macroscopique des colonies des bactéries isolée obtenus 27h d'incubation à 37°C sur milieu MRS solide.....	65
Figure 32 : Aspect macroscopique des bactéries isolé obtenus 2h d'incubation à 37°C sur bouillon MRS.....	66
Figure 33 : Aspect microscopique des bactéries lactique après coloration de Gram (G×100).....	66
Figure 34 : résultats de test catalase des bactéries lactiques isolées.....	68
Figure 35 : résultats de test type fermentaire des bactéries lactiques.....	69
Figure 36 : les résultats de test de mannitol mobilité.....	69
Figure 37 : résultats du test de croissance à différentes températures.....	70

Figure 38 : les résultats de la thermorésistante.....	71
Figure 39 : les résultats de l'effet d'oxygène sur les bactéries lactiques isolées.....	71
Figure 40 : les résultats de la croissance des bactéries lactiques à différents.....	72
Figure 41 : les résultats d'antibiogramme des souches lactiques après incubation 24h à 37°C sur le milieu Muller Hinton solide.....	73
Figure 42 : les résultats d'antibiogramme des souches lactiques incubées pendant 24h à 37°C sur milieu MRS gélose.....	74
Figure 43 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche <i>d'E- coli</i> par la méthode de diffusion en puits.....	76
Figure 44 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des en puits.....	77
Figure 45 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la méthode des diff puits.....	77
Figure 46 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche <i>d'E- coli</i> par la méthode de disque.....	78
Figure 47 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la méthode de disque.....	79
Figure 48 : les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> .par la méthode de disque.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition moyenne du lait de différentes espèces animales (Lapointe-Vignola et Québec 2002).....	05
Tableau 2 : composition chimiques du lait d'après Guegen (1997)	10
Tableau 3 : Concentration des minéraux et oligoéléments dans le lait de chèvre (Favier et al., 1995).....	14
Tableau 4 : type fermentaire des bactéries lactiques (Dilmi Bouras ,1991).....	26
Tableau 5 : la classification des bactériocines de bactéries lactiques (Luquet et Corrieu 2005).....	33
Tableau 6 : Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments(Taale et al. 2016).....	45
Tableau 7 : Les codes des souches lactique isolées.....	64
Tableau 8 : présentation des critères morphologiques et biochimiques, des 6 isolats présumés des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre.....	67
Tableau 9 : les critères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre.....	72
Tableau 10 : les résultats de l'antibiogramme des souches lactiques isolées.....	75
Tableau 11 : le spectre d'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode de diffusion en puits et la méthode de disque vis-à-vis des souches pathogènes.....	80

Table des matières

Introduction	1
I. Généralités sur le lait	3
I.1.Définition du lait	3
I.2.Composition du lait	4
I.3.Définition du lait de chèvre	5
I.3.1.La population caprine en Algérie	6
I.3.2.Population locale	7
Figure 1 : le règne caprine en Algérie.....	7
I.4.Caractérisation du lait de chèvre	8
I.4.1.Les caractères physico-chimiques	8
I.4.2.Les caractères organoleptiques	8
I.5.Composition de lait de chèvre	9
I.5.1.Eau	9
I.5.2.La matière grasse.....	9
I.5.3.Les protéines	10
I.5.4.Matière azotée	11
I.5.7.Les vitamines	12
I.5.8.Les enzymes	12
I.5.9.Les sels minéraux	13
I.6.Les caractéristiques microbiologiques du lait de chèvre.....	13
I.6.1.la flore originelle	14
I.6.2.Les bactéries lactiques	14
I.6.3.Flore de contamination	14
I.7.Valeur nutritionnelle du lait de chèvre	14
I.8.Importance du lait de chèvre	15
II.Généralités sur les bactéries lactiques	17
Introduction	17
II.1.Historique	17
II.2.Définition.....	18
II.3.Origine des bactéries lactiques	18
II.4.Habitat des bactéries lactiques	18
II.5.Culture des bactéries lactiques	19
II.6.La taxonomie des bactéries lactiques	19
II.7.Diversité des bactéries lactiques	20
II.8.Classification des bactéries lactiques	21

II.8.1.Le genre <i>Lactobacillus</i> :	21
II.8.2.Le genre <i>Lactococcus</i>	22
II.8.3.Le genre <i>Streptococcus</i>	22
II.8.4.Le genre <i>Enterococcus</i>	23
II.8.5.Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	23
II.8.6.Le genre <i>Bifidobacterium</i>	24
II.8.7.Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	24
II.9.Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	25
II.10.Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :	27
II.10.1.Aptitude acidifiante.....	27
II.10.2.Aptitude protéolytique	27
II.10.4.Aptitude aromatisante	28
II.10.5.Aptitude texturante.....	28
II.10.6.Activité antimicrobienne	28
II.11.Utilisation des bactéries lactiques	29
II.11.1.Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s) :.....	29
II.11.2.Utilisation des bactéries lactique comme des probiotiques.....	29
III.Les bactériocines « les inhibiteurs spécifiques » des bactéries lactiques	31
III.1.Généralités sur les bactériocines	31
III.2.Historiques des bactériocines.....	31
III.3.Définition	32
III.4.Nature	32
III.5.La classification des bactériocines	33
III.5.1. Classe I. Lantibiotiques.....	34
III.5.2.Classe II. Peptides non modifiés	35
III.5.3. Classe III.Protéines	37
III.5.4. Classe IV. Bactériocines complexes	37
III.6.Production et conditionnement des bactériocines	38
III.7.Le conditionnement des bactériocines	39
III.8.Organisation génétique des bactériocines	39
III.9.les mécanismes d'action des bactériocines	40
III.9.1.Le mécanisme d'action des antibiotiques et bactériocines de classe II et la classe III.....	41
III.10.Comparaison entre les bactériocines et les antibiotiques	42
III.11.Les applications des bactériocines	43
III.11.1.application des bactériocines dans le secteur alimentaire.....	43

III.11.2 application des bactériocines dans le secteur médicale	44
III.11.3.application des bactériocines dans le secteur d'Hygiène et santé.....	45
III.12.Impact économique des bactériocines.....	45
IV. Matériel et Méthodes.....	46
IV.1.L'objectif du travail.....	46
IV.2.Lieu et période d'étude.....	46
IV.2.1.Provenance et collection d'échantillon	46
IV.2.2.Conditions de prélèvement de l'échantillon.....	46
IV.3.Matériels.....	47
IV.3.1Matériel biologique	47
IV.3.2.Matériels non biologique.....	48
IV.4.Méthodes.....	49
IV.4.1.Préparation de l'inoculum et l'isolement.....	49
IV.4.2.Préparation des dilutions décimales	49
IV.4.3.Isolement des bactéries lactiques.....	49
IV.4.4.Etape de l'enrichissement	50
IV.4.5.Purification des isolats de bactéries lactiques	51
IV.5. Identification des souches.....	54
IV.5.Caractérisation phénotypique des souches.....	54
IV.5.1.Examens macroscopique des cultures	54
IV.6.Caractérisation morphologique des souches	54
IV.6.1.La coloration de Gram	54
IV.7.Caractérisation biochimiques	55
IV.7.1.Test de catalase.....	55
IV.7.2.Test oxydase	56
IV.7.3.Type fermentaire	56
IV.8.Caractérisation physiologiques.....	57
IV.8.1.Test de Mannitol-mobilité	57
IV.8.2.Test de Croissance à différentes températures	58
IV.8.3.Thermorésistante à 62°C pendant 30 minutes :	58
IV.8.4.Test de croissance en différentes pH	59
IV.8.5.L'effet d'oxygène	59
IV.9.Test de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme) :	59
IV.10.TEST DE L'ANTAGONISME (LA RECHERCHE DES BACTERIOCINES	60

IV.10.1.Mise en évidence de la production de bactériocines	60
IV.10.2.La méthode de diffusion en puits	60
IV.10.3.La méthode des disques	62
V.Isolement et identification des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre:	64
V.1.Isolement et identification	64
V.2.Purification et caractérisation des isolats	64
V.3.Pré –identification des souches lactiques	65
V.3.1.Caractérisation macroscopique	65
V.3.2.Caractérisation microscopique	66
V.4.Les tests physiologiques	68
V.4.1.Recherche de catalase	68
V.4.2.Recherche de type fermentaire.....	68
V.4.3. Test de mannitol mobilité	69
V.4.4.Croissance à différentes température.....	69
V.4.5.Test de thermorésistante	70
V.4.6.Effet d'oxygène	71
V.4.7.Test de croissance à différent valeurs de pH.....	71
V.5.Test de l'antibiogramme :	72
V.6.Test de l'antagonisme (recherche des bactériocines	75
V.6.1.Méthode de diffusion en puits.....	75
V.6.2.Méthode de disques	77
V.CONCLUSION	81

Introduction

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Non pathogènes, ces bactéries à coloration de gram positive (Gram+) ont un métabolisme anaérobie facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau). Leur utilisation est apparue, depuis des millénaires, dans la fabrication des aliments comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, le pain au levain, les sauces, les saumures, les légumes fermentés, les ensilages etc. Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente (**Badis et al., 2005**), ces bactéries synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reuterine et les bactériocines (**De Vuyst et Vandamme, 1994**), qui sont des peptides, produits et secrétés à l'extérieure de la cellule des bactéries lactiques. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**Jack et al., 1995 ; Matilla et al., 1999**). Ces bactériocines naturelles, produites par les bactéries lactiques, pourraient être utilisées pour améliorer la qualité et la sécurité des aliments. La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234), produite par la souche *Lactococcus lactis* (**Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst et al., 1996**).

L'objectif de notre étude consiste à isoler des souches de bactéries lactiques à partir de lait cru de chèvre et d'évaluer leur activité antagoniste vis-à-vis de certaines souches pathogènes.

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes.

Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries

Pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (**Dortu et Thonart, 2009**). L'activité inhibitrice des bactéries lactiques peut être attribuée à plusieurs substances telles les acides organiques (l'acide lactique, acétique, ...etc.), le CO₂, la reutérine, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Partie bibliographique

Chapitre I :

le lait

I. Généralités sur le lait

Le lait est un des produits de base de l'alimentation humaine. Il est, comme la plupart des matières premières d'origine biologique, très périssable : il s'altère rapidement par voie enzymatique et par voie microbienne. Sa forte dérivabilité naturelle, a contraint l'homme à inventer des moyens de différer son altération. Ainsi plusieurs procédés de transformation du lait en produits dérivés (fromages, laits fermentés, laits en poudre) sont connus depuis des siècles. Ces procédés ancestraux sont encore de nos jours utilisés dans la préparation des produits laitiers fabriqués dans les usines ultra modernes.

Le lait, destiné à l'alimentation humaine, est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée.

Contaminé, il peut être un vecteur de transmission de germes pathogènes à l'homme et peut présenter un risque pour la santé humaine (AGGAD, F., et Mebrouk 2009).

Le lait est le liquide sécrété par les mammifères femelles dans le but de nourrir leur progéniture. Le lait est considéré comme un aliment humain presque complet qui peut être généralement consommé sans autre transformation. Bien qu'il soit très essentiel pour l'alimentation des nourrissons, le lait et les produits laitiers occupent une place importante dans notre alimentation tout au long de la vie. Le lait peut être défini comme la sécrétion lactée entière, fraîche et propre obtenue par la traite complète d'un ou de plusieurs animaux laitiers en bonne santé, à l'exclusion de celle obtenue dans les 15 jours précédant la parturition et les 15 jours suivant le vêlage ou pendant les périodes nécessaires pour rendre le lait pratiquement exempt de colostrum et contenant les pourcentages minimums prescrits de matières grasses du lait et de solides non gras du lait (SNF) (Mehta ,2015).

I.1.Définition du lait

Au sens du règlement européen CEE n° 1898/87, concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation, les produits laitiers sont définis comme « les produits dérivés exclusivement du lait, étant entendu que des substances nécessaires pour leur fabrication peuvent être ajoutées , pourvu que ces substances ne soient pas utilisées en vue de remplacer ,en tout partie ,l'un quel- conque des constituants du lait » (Luquet et Corrieu ,2005)

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, il constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (Chye et Ayob ,2004). Et d'après Mehta le lait est un produit complexe et nutritif qui contient plus de 100 substances qui sont soit en émulsion, en suspension ou en solution dans l'eau. Divers facteurs tels que des facteurs génétiques, le stade de la lactation, l'état de santé de l'animal et des facteurs environnementaux sont responsables de la grande variation de la composition du lait (Mehta ,2015).

Le Congrès International de la répression des fraudes qui s'est tenu à Paris en 1909 a défini le lait comme : "le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum". Cette définition à caractère général est applicable aux laits de vache, de chèvre, de brebis, et, bien qu'ancienne, reste valable (Le Mens, 1985). Les laits des différentes familles de mammifères ont dans l'ensemble des compositions semblables. Toutefois, les proportions des principaux constituants peuvent varier de façon notable d'une famille à l'autre, et au sein d'une même famille d'une espèce à l'autre. En revanche, les variations sont moindres d'une race à l'autre au sein d'une même espèce (Jeness et Sloan, 1970). Le lait, destiné à l'alimentation humaine, est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Contaminé, il peut être un vecteur de transmission de germes pathogènes à l'homme et peut présenter un risque pour la santé humaine. L'évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique du lait cru destiné à la consommation ou à la transformation est donc essentielle pour la protection du consommateur (AGGAD, F., et Mebrouk ,2009).

I.2.Composition du lait

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion. Les constituants les plus importants sont l'eau , les matières grasses ,les protéines , les glucides , les minéraux , les vitamines et les enzymes (Lapointe-Vignola et Québec, 2002).

Tableau 1 : composition moyenne du lait de différentes espèces animales (Lapointe-Vignola et Québec ,2002).

Animaux	Eau (%)	Matière grasse (%)	Protéines(%)	Glucides (%)	Minéraux (%)
Vache	87.5	3.7	3.2	4.6	0.8
Chèvre	87.0	3.8	2.9	4.4	0.9
Brebis	81.5	7.4	5.3	4.8	1.0
Chamelle	87.6	5.4	3.0	3.3	0.7
Jument	88.9	1.9	2.5	6.2	0.5

Chimiquement, le lait est un mélange hétérogène qui peut être défini comme une substance chimique complexe dans laquelle les matières grasses sont émulsionnées sous forme de globules (2 000-6 000 nm), les principales protéines du lait (caséine, 50-300 nm) et certaines matières minérales à l'état colloïdal, ainsi que certains minéraux et protéines de lactosérum solubles (4-6 nm) sous forme de de solution vraie. Le lactose, le sel et les autres constituants solubles mineurs ont un diamètre de 0,5 nm. Le nombre de globules de matière grasse du lait, de micelles de caséine, de protéines de lactosérum et de lactose par ml de lait est de 1010, 1014, 1077 et 1019, respectivement. Les multiples constituants dans différents états et phases existent dans un équilibre délicat qui assure la stabilité du lait dans des conditions normales. Le pH du lait normal varie de 6,5 à 6,7 (Mehta, 2015).

I.3.Définition du lait de chèvre

Le lait est un liquide blanc à reflets plus ou moins bleuâtres, onctueux et gras ; il est doué d'une légère odeur aromatique qui rappelle un tant soit peu l'animal dont il provient. Sa densité varie entre 1028 et 1035 (lait de vache) («^oTraité pratique de laiterie: lait, crème, beurre, fromages - Albert Larbalétrier.).

Le lait de chèvre est un liquide blanc composé de lipides en émulsion sous forme de globules, de caséines en suspension colloïdale, de protéine du sérum en solution colloïdale, de lactose et de minéraux en solution. comparé au lait de vache , il est légèrement plus blanc (Lapointe-Vignola et Québec, 2002).

Le lait de chèvre, en raison de ses caractéristiques de composition, est considéré comme une matière première de haute qualité pour la production d'aliments pour bébés, pour les personnes âgées et pour certains secteurs de la population ayant des besoins particuliers. Par rapport au lait de vache, sa fraction protéique est plus digeste

et moins allergène, sa fraction lipidique est plus digeste, et sa teneur en minéraux et sa disponibilité nutritionnelle sont de meilleure qualité que celles du lait de vache (**Picon et al.,2019**).

Le lait de chèvre est l'aliment le plus complet que l'on connaisse, un aliment naturel hautement compatible et nourrissant. Il est tellement nutritif qu'il peut en fait servir de substitut à un repas. Il est également préféré en raison de sa faible teneur en graisses et de sa capacité à neutraliser les acides et les toxines présents dans l'organisme (**Dagnaw et al., 2016**). Son goût légèrement sucré Il est caractérisés par une saveur particulière et un goût plus relevé que le lait de vache (**Jouyandeh et Abroumand, 2010**). Du point de vue de ces qualités nutritives et digestives, le lait de chèvre possède une valeur de premier ordre. Il est moins allergène et subit plus lentement la fermentation lactique que celui de la vache (**Gelais, 2002**).

I.3.1.La population caprine en Algérie

Les chèvres laitières sont traditionnellement utilisées pour la production de lait dans le monde entier, et en particulier en Asie, en Afrique et en Europe, qui produisent respectivement 58,4 %, 24,1 % et 14,2 % du lait de chèvre mondial. Les systèmes de production de chèvres laitières se développant dans des environnements arides et semi-arides tels que l'Asie et l'Afrique, la production mondiale de chèvres laitières représente principalement des systèmes de production extensifs dont le lait est autoconsommé. Cependant, une plus petite proportion du lait de chèvre mondial, produite principalement en Europe et en Amérique latine, est transformée en produits laitiers. Bien que l'élevage de chèvres laitières soit traditionnellement pratiqué dans le sud de l'Europe, y compris dans des systèmes de production d'intensité variable (**Wassie et Wassie ,2016**).

En Algérie, l'élevage caprin vient en seconde position (14%) après les ovins (26%). Il se trouve concentré essentiellement dans les zones de montagnes, des hauts plateaux et des régions arides. Il est caractérisé par son adaptation aux conditions climatiques du pays et contribue à la formation du revenu et à la couverture de besoins en lait et viande d'une large couche de la population dans la plupart des zones difficiles (montagnes, hauts plateaux et régions arides). Au cours de la dernière décennie, la production laitière annuelle est d'environ 1 milliard de litres dont 13% de lait de chèvre. La transformation du lait de chèvre en Raïb, Lben et Jben (fromage

traditionnel), le plus souvent de qualité sensorielle variée, se fait par fermentation spontanée (Badis et al., 2005).

I.3.2.Population locale

Caractérisée par son corps anguleux, taille appréciable, mamelle développée et des poils longs des robes différentes couleurs. Le poids des chevreaux à la naissance est de 2 kg 500 g et à 5 mois 25 kg (Khelifi Y, 1999). Bien que relativement homogène, mais selon plusieurs auteurs comme (Kerboua et al., 2003; Madani et al., 2003 ; Fantazi, 2004) la population locale est divisée en trois sous populations :

- La chèvre arabe divisée en deux races : l'Arabia et la Makatia
- La chèvre Kabyle
- La chèvre du M'zab



Figure 1 : le règne caprine en Algérie

I.3.3.La production du lait de chèvre en Algérie

La production moyenne du lait de chèvre en Algérie est de 1 l/jour pendant 4 à 5 mois. Ce lait est utilisé pour la consommation familiale et la fabrication des sous-produits laitiers en plus de l'allaitement des chevreaux. Cette faculté du caprin a incité certains éleveurs à s'intéresser à la création d'élevages semi-industriels actuellement très encouragés par la politique participative de l'état vis-à-vis de la production laitières tant bovine que caprine (Khelifi Y,1999).

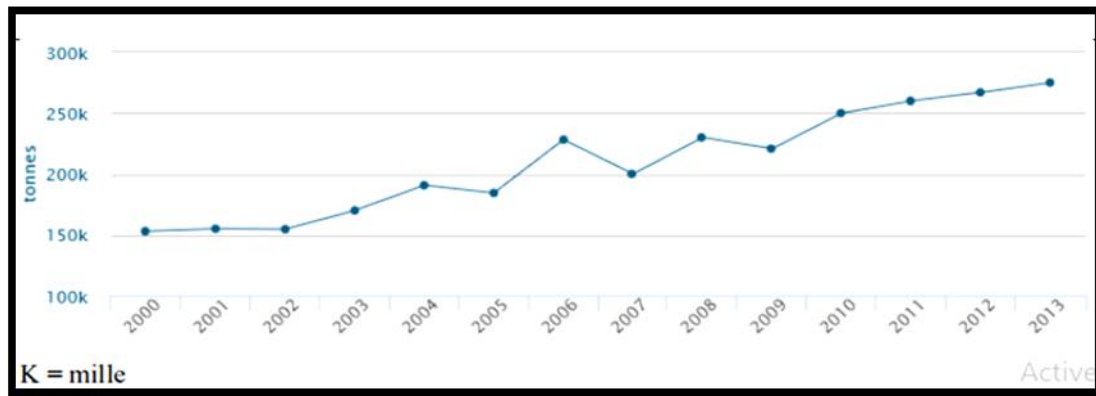


Figure 2 : représente l'évolution de la production de lait de chèvre en Algérie pendant les quinze dernières années (FAO, 2015).

Le graphe montre une évolution en dent de scie de la collecte national du lait de chèvre, malgré que cette dernière progresse notamment à partir de 2002 en passant de 154,5 milles de litre pour atteindre 275 milles de litre en 2013, mais elle reste toujours faible comparativement aux besoins de consommation.

I.4. Caractérisation du lait de chèvre

I.4.1. Les caractères physico-chimiques

Les principales propriétés physicochimiques utilisées dans l'industrie laitière sont :

- La masse volumique
- La densité
- Le point de congélation
- Le point d'ébullition
- L'acidité

I.4.2. Les caractères organoleptiques

Couleur : blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas de β -Carotène, aussi le beurre de chèvre a -t-il une couleur blanche.

Odeur : fraîchement traité, le lait de chèvre a une odeur assez neutre parfois en fin de lactation, il a une odeur dite Caprique

Saveur : douceâtre agréable particulièrement au lait .le lait de chèvre fraîchement trait possède une saveur plutôt neutre ; par contre, après stockage au froid il acquiert une saveur caractéristique.

Dans certains pays anglo-saxons, la saveur du lait de chèvre est un critère de sélection car sa commercialisation en l'état est très répandue.

Aspect : propre, sans grumeaux (**Lapointe-Vignola et Québec, 2002**).

I.5.Composition de lait de chèvre

Les recherches menées au cours des dernières décennies ont permis d'étendre les connaissances sur les caractéristiques fondamentales sur la composition et les propriétés de lait de chèvre. La composition varie en fonction de plusieurs facteurs, tels que l'animal, la race, l'alimentation, l'âge de la lactation, le stade de la lactation et l'environnement (**Kalyankar, Khedkar, et Patil ,2016**).

I.5.1.Eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaire telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum (**Amiot et al., 2002**). D'après (**Brugère , 2003**) le lait de chèvre constitué de 99% du l'eau.

Tableau 2 : Composition chimique du lait d'après **Guegen (1997)**.

Composants chimiques	Lait de chèvre (g/l)
Eau	90
Matière protéique	30.8
Matière grasse	34.4
Lactose	48
Calcium	1.25
Phosphore	0.95

I.5.2.La matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait sous forme de gouttelettes de triglycérides entourées par une membrane complexe provenant de la cellule épithéliale mammaire,

appelée membrane des globules gras. Le pourcentage de matière grasse totale et la composition en acides gras dépend du régime alimentaire des espèces. La graisse est composée de plusieurs centaines d'acides gras dont la part dans le pool total d'acides gras est considérablement différenciée. La part de cinq de ces acides (C10:0, C14:0, C16:0, C18:0, et C:18-1 cis) représente plus de 75 % des acides gras totaux du lait. L'épaisseur de la membrane des globules gras de la chèvre est plus épaisse que celle du lait de vache (Kalyankar, Khedkar, et Patil, 2016).

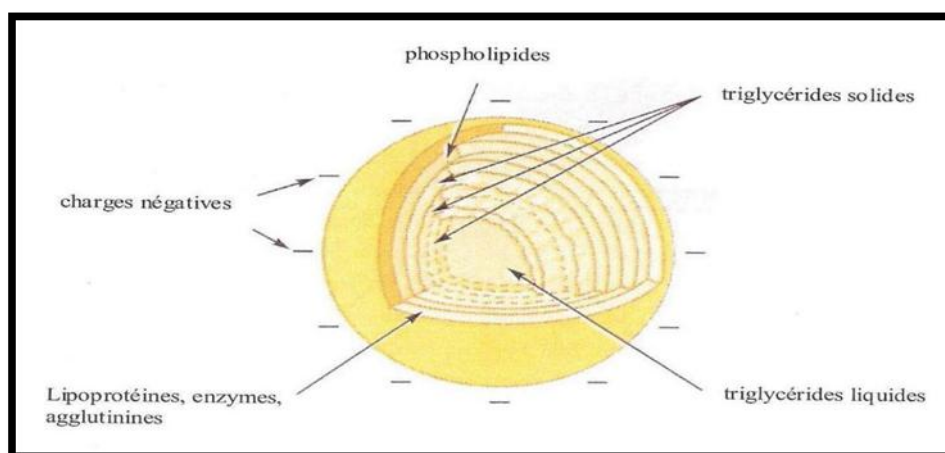


Figure 3 : Composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).

I.5.3. Les protéines

Les protéines de lait de chèvre comme celles des autres espèces de mammifères, sont composées de deux fractions l'une majoritaire dénommée caséines (représentent environ 80%) (Mahé et al., 1993). Cette dernière précipite à pH 4,2 pour le lait de chèvre et 4,6 pour le lait de vache (Masie et Morgan, 2001). L'autre minoritaire et dénommée protéine sériques se caractérise par leur solubilité dans le pH 4,2 (chanokphat, 2005). Cinq protéines principales de lait de chèvre qui sont : l'-lactalbumine, la b-lactoglobuline, k-caséine, b-caséine et as2-caséine (Kalyankar, Khedkar, et Patil, 2016).

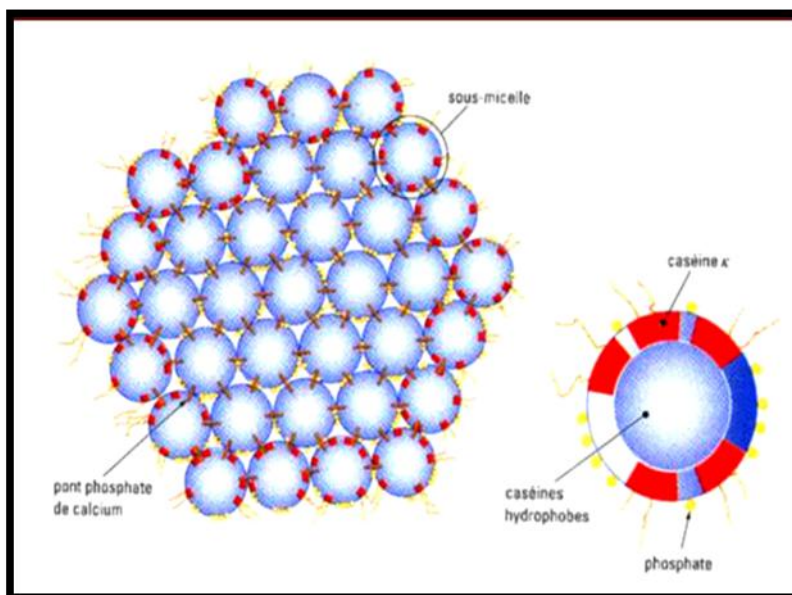


Figure 4 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot *et al.*, 2002).

Le pourcentage relatif de protéines est similaire chez la vache et la chèvre, malgré les affirmations passées selon lesquelles la teneur en protéines du lait de chèvre est plus faible. Cette variation de la teneur en protéines est due en partie à un manque de normalisation des procédures de testage des protéines ainsi qu'aux grandes différences rencontrées parmi les animaux considérés comme étant de la même race et aux différences entre les races (Dagnaw *et al.*, 2016).

I.5.4. Matière azotée

Selon Lupient (1995). Les matières azotées du lait constituent un ensemble complexe dont la teneur totale avoisine (35g/l). on distingue deux types de matières azotées dans le lait :

- Les matières azotées non protéiques pour 5%.
- Les protéines pour 95%.

I.5.5. Les glucides

Comme dans la majorité des laits de Mammifères, le lactose représente la principale forme de glucide. En présence d'une enzyme, la β -galactosidase présente dans les bactéries lactiques la molécule de lactose est coupée en deux pour libérer le galactose et le glucose, ce derniers sont utilisés pour la production d'acide lactique (Gelais *et al.*, 1999). Le pourcentage de lactose est légèrement inférieur dans le lait de chèvre par rapport au lait de vache (Amiot *et al.*, 2002).

I.5.6.L'énergie

Le lait de chèvre est une source importante d'énergie, apportant 700 kcal. Cette caractéristique peut probablement expliquer de nombreuses observations de gain de poids chez l'enfant malade. En fait, l'utilisation du lait de chèvre dans cette situation est recommandée depuis fort longtemps (**Desjeux, 1904**).

I.5.7.Les vitamines

Le lait de chèvre se distingue du lait de vache par sa teneur beaucoup plus faible en B1 (thiamine). La signification de cette différence n'est pas tout à fait claire. Il est remarquable que le lait de chèvre tire sa puissance en vitamine A entièrement de la vitamine elle-même et qu'il est entièrement dépourvu des précurseurs pigments caroténoïdes caractéristiques du lait bovin, ce qui explique également que le lait et la matière grasse du lait de chèvre soient de couleur beaucoup plus blanche que le lait de vache, en raison de leur teneur plus élevée en caséine. Il contient généralement 25 % de plus de vitamine B6 et 47 % de plus de vitamine A que le lait de vache ordinaire et contient principalement de la vitamine A2 (**Amigo et Fontecha, 2020**).

I.5.8.Les enzymes

Les enzymes du lait de chèvre sont similaires à celles de la vache, bien que certaines différences spécifiques sauf que où niveau de le site de phosphatase alcaline est légèrement inférieur à celui trouvé chez les vaches. L'enzyme présente le même degré de sensibilité à la chaleur et sert donc tout aussi bien de marqueur de pasteurisation. L'activité de la peroxydase dans le lait des deux espèces est la même à tous égards, tandis que le niveau de la xanthine oxydase est plus faible dans le lait de chèvre. Des niveaux d'activité sont plus élevés pour la ribonucléase et le lysozyme (**Dagnaw et al., 2016**).

I.5.9. Les sels minéraux

Le lait contient des minéraux majeurs et des oligo-éléments, notamment Ca, Na, Mg, P, K et Zn, Mn, Se, Co, Cu, Fe respectivement. Par exemple, le lait est une bonne source de calcium, contenant environ 13 % de plus de calcium par portion que le lait de vache, ce qui en fait l'un des minéraux naturels prédominants dans le lait et contenant environ 134 % de plus d'élément K, Ce programme d'alimentation en minéraux naturels comprenant du lait de chèvre peut apporter d'excellents bénéfices pour la santé (Dagnaw et al., 2016).

Tableau 3 : Concentration des minéraux et oligoéléments dans le lait de chèvre (Favier et al., 1995).

Lait de chèvre	Concentration(‰)
Minéraux Sodium	0,37
Potassium	1,55
Calcium	1,35
Magnésium	0,14
Phosphore	0,92
Chlore	2,20
Oligo – éléments	
Fer	0,55
Cuivre	0,40
Zinc	3,20
Manganèse	0,06

I.6. Les caractéristiques microbiologiques du lait de chèvre

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5 000 g/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores, microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles (Larpent, 1991).

La présence d'agents pathogènes dans le lait peut s'expliquer par une infection de

l'animal par d'autres animaux ou par l'homme (brucellose, salmonellose, la staphylococcie et la listériose) (**Paraf et Paltre , 1991**).

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif (**Billon et al., 2009**).

Certains microorganismes constituent un danger pour le consommateur du lait cru ou de produits fabriqués avec du lait cru. D'autres sont seulement des agents d'altération de ces produits, ils dégradent les composants du lait en donnant des produits de métabolisme indésirables (**Guiraud, 1998**).

I.6.1.la flore originelle

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (**Vignola, 2002**).

I.6.2.Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Ces bactéries produisent de l'acide lactique, éventuellement d'autres produits de Fermentation. L'acidité produite permet la conservation de l'aliment en inhibant la culture de très nombreuses bactéries.

I.6.3.Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

I.7.Valeur nutritionnelle du lait de chèvre

La plupart des habitants de la planète boivent du lait de chèvre parce qu'il est :

- le plus proche du lait humain et facilement accepté, notamment par les personnes jeunes ou fragiles.

- Le lait de chèvre ne forme pas de mucus (flegme) et est mieux toléré par les asthmatiques et les personnes allergiques et contient plus de chlore, de fluor et de silicium que tout autre animal domestique. Le chlore et le fluor sont des substances naturelles.
- Le lait de chèvre est plus digeste, car les molécules de graisse sont plus petites que celles du lait de vache et présente moins de séparation de la crème en raison des molécules de graisse plus petites et contient aussi le précurseur de la vitamine A dans la matière grasse du lait, ce qui permet à l'organisme de l'utiliser facilement (**Dagnaw et al., 2016**).

I.8.Importance du lait de chèvre

Le microbiote du lait cru de chèvre joue un rôle important dans les caractéristiques sensorielles et texturales des fromages au lait cru, et il peut également avoir des effets bénéfiques sur la santé des consommateurs. Cependant, les bactéries décarboxylase-positives présentes dans le lait cru sont également responsables de la production d'amines biogènes, et l'accumulation d'amines biogènes dans le fromage est un problème de santé publique (**Picon et al., 2019**). Le lait de chèvre est une excellente source d'alimentation, le nombre de chèvres dans le monde a augmenté d'environ 55% entre 1991 et 2011, alors que, le nombre de bovins a augmenté de 9% et que le nombre de moutons a diminué d'environ 7 %. La production de lait de chèvre a augmenté d'environ 70% entre 1991 et 2011, ce qui laisse présager un avenir prometteur pour ce secteur. L'un des facteurs les plus déterminants de la croissance de la consommation de lait de chèvre et de produits dérivés est leur effet bénéfique perçu sur la santé humaine, qui est d'ailleurs pleinement reconnu par la communauté scientifique. le lait Chèvre a une odeur et un goût acceptables et attrayants. Peut être consommé comme une alternative au lait de vache car il est moins allergène, et d'une digestibilité supérieure (**García et al., 2014**).

Le lait de chèvre et ses produits ont gagné en popularité récemment en raison de la recherche d'une consommation alimentaire verte et favorable à la santé. Le lait de chèvre contient moins de caséine, notamment d' α S1-caséine, que le lait de vache, ce qui contribue à ses propriétés hypoallergéniques. En outre, le lait de chèvre est plus digeste que le lait de vache en raison de sa teneur élevée en acides gras à chaîne courte et de ses petits globules gras. Toutefois, en raison de la présence de lipases et d'enzymes lipolytiques dans le lait de chèvre, certaines manipulations inadéquates

(par exemple, une traite inadéquate, une réfrigération et une pasteurisation dans un laps de temps relativement court après la traite activeront les enzymes et donneront au lait de chèvre un aspect caractéristique de chèvre. et donnent au lait de chèvre un goût caractéristique de chèvre. Cette saveur affecte l'appréciation des produits à base de lait de chèvre, ce qui pourrait probablement limiter la croissance du marché des produits à base de lait de chèvre. Cette limitation est considérable pour certains consommateurs qui souffrent d'une allergie aux protéines du lait de vache, notamment dans les pays en développement (**Huang et al.,2020**).

Chapitre II :

les bactéries lactiques

II. Généralités sur les bactéries lactiques

Introduction

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production des acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu et par la synthèse de bactériocines qui renforcent cette conservation. La flore originelle lactique des laits crus a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique des bactéries lactiques (**BEKHOUCHE et BOULAHROUF, 2005**).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités (microorganismes Generally Recognized As Safe). Lorsqu'elles sont ingérées vivantes en grandes quantités, elles peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, où elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques sur l'hôte après leur ingestion (ex. amélioration de la digestion des fibres, stimulation du système immunitaire et prévention ou traitement des diarrhées) (**Bermúdez-Humarán et Langella, 2009**).

II.1. Historique

De la préhistoire au XIX^e siècle, les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie et dont les fossiles très bien conservés datent d'environ 2,7 milliards d'années.

Il y a environ 8000 ans pour que les bactéries puissent jouer un rôle dans l'alimentation des hommes. Dans le 19^e siècle et surtout l'époque fondatrice de la microbiologie entre 1860 et 1900 les bactéries et parmi elles les bactéries lactiques ont été identifiées et leur rôle compris. Du XIX^e siècle à nos jours, le rôle et l'utilisation des bactéries lactiques Conn, en 1889 aux USA et Storck, en 1890 au

Danemark identifieront le rôle des bactéries lactiques dans la coagulation acide du lait. En 1897 Von Freudenreich isole un Streptocoque lactique. La production des cultures de bactéries lactiques et l'emploi de ferment se développent au début du 20^{ème} siècle (**Dridier Djamel ,2009**).

II.2.Définition

Le terme "bactéries lactiques" désigne les espèces des genres suivants :

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Les espèces incluses sont toutes capables de produire de l'acide lactique en quantités considérables. Elles sont Gram-positives et catalase et oxydase-négatives et sont fastidieuses dans leurs besoins nutritionnels. Leur croissance est considérablement améliorée par des conditions microaérophiles (**Reuter ,1985**).

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Non pathogènes, ces bactéries ont un métabolisme anaérobie facultatif (**Badis et al., 2005**). Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires. Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents :

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Dortu et Thonart ,2009**).

II.3.Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont rencontrées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie mais des autres études antérieures sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (**Quiberoni et al., 2001**).

II.4.Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont naturellement présentes dans le lait et les produits laitiers. et sont généralement associées à des habitats riches en nutriments tels que le

lait, le fromage, la viande, les boissons et les légumes. En outre, des études ont montré que les bactéries lactiques pouvaient également être isolées du sol, des lacs, du tractus intestinal des animaux et des humains (**Wassie et Wassie ,2016**).sont des habitants indigènes du tractus gastro-intestinal humain. et sont utilisées depuis longtemps dans les aliments et les produits fermentés comme cultures de départ (**de Almeida Júnior et al., 2015**).

II.5.Culture des bactéries lactiques

Une approche courante de l'isolement des bactéries lactiques consiste à utiliser un milieu d'usage général tel que APT Agar, Rogosa Agar, ou MRS Agar et ensuite de employer un milieu différentiel homofermentaire et hétéro-fermentaire (HHD) ou un milieu MRS modifié. L'utilisation d'un bouillon ou d'une gélose MRS a gagné l'acceptation comme milieu polyvalent en raison de sa capacité à supporter une variété de bactéries lactiques. Le nom MRS provient de la formule de Man, Rogosa, et Sharpe (1960) (**Carr, Chill, et Maida, 2002**).

II.6.La taxonomie des bactéries lactiques

La taxonomie des BL reposait sur des caractéristiques morphologiques et Physiologiques. La première définition technique, celle **deOrla-Jensen**, reconnaissait les BL comme :

- Des cocci ou des bacilles à Gram positif.
- Des bactéries non sporulés et non mobiles.
- La capacité de cataboliser les sucres principalement en acide lactique comme principal produit final de la fermentation des sucres.
- Des bactéries micro-aérophiles ou anaérobies
- Catalase et cytochrome négatifs, fastidieux, aérotolérants et tolérants aux acides
- Bactéries non pathogènes
- Des bactéries polyauxotrophes (capacité de biosynthèse faible , exigence pour les acides aminés , bases nucléiques , vitamines , acides gras).

Ces critères de classification ont conduit à une définition large des BL comprenant diverses bactéries. Au cours des années 1990, les progrès des techniques moléculaires ont permis une description plus élaborée des BL qui ont généralement une faible teneur en GC (50 mol%), alors que certains lactobacilles ont été signalés comme

pouvant atteindre jusqu'à 57 % en moles. Les genres les plus courants de BL considérés comme étant liés aux aliments sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, et *Weissella* (**Papadimitriou et al. 2016**).

Les LAB comprennent un groupe génétiquement et écologiquement diversifié, y compris plusieurs genres (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, etc. dans l'ordre des *Lactobacillales*) appartenant à l'embranchement des *Firmicutes*. Et le genre anaérobie *Bifidobacterium* appartenant au phylum *Actinobacteria*. Les cultures de départ les plus commercialisées sont représentées par les espèces *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, tandis que les probiotiques les plus couramment cités appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, en particulier les premiers en raison de leurs effets antimicrobiens connus et d'autres avantages pour la santé. Les génomes des BL sont caractérisés par une petite taille allant de 1,23 Mb (*Lactobacillus sanfranciscensis*) à 4,91 Mb (*Lactobacillus parakefiri*) (**Hatti-Kaul et al., 2018**).

II.7. Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Et l'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une évolution taxonomique (**Vandamme et al., 1996**).

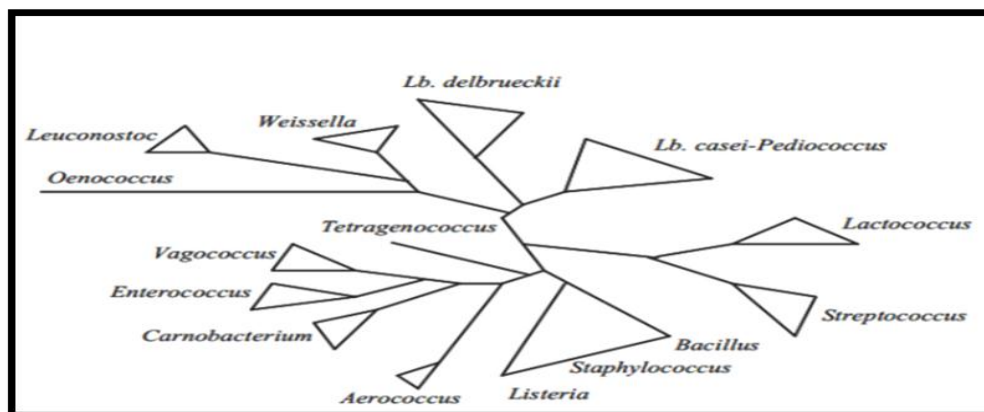


Figure 5 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (**Axelsson, 2004**).

II.8. Classification des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques compte après plusieurs révisions taxonomiques des genres qui appartiennent tous au *phylum Firmicute* (Leonard, 2013).

II.8.1. Le genre *Lactobacillus* :

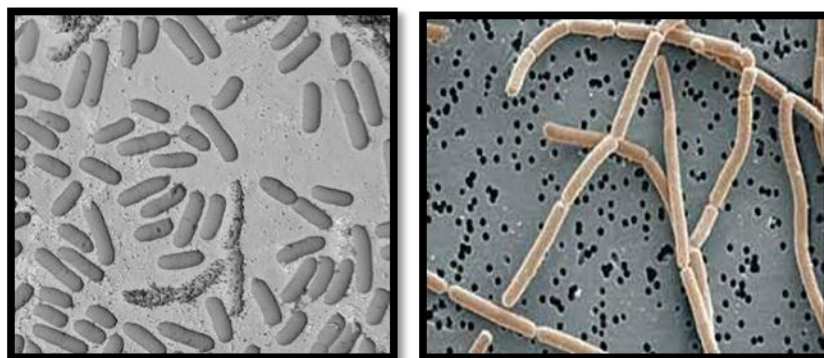
C'est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994). Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.



A : *Lactobacillus helveticus*

B : *Lactobacillus delbrueckii*

Figure 6 : observation microscopique à transmission (×1000) référence électronique

II.8.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).



Figure 7 : Morphologie en microscopie électronique d'*Lactococcus lactis*.

II.8.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

II.8.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

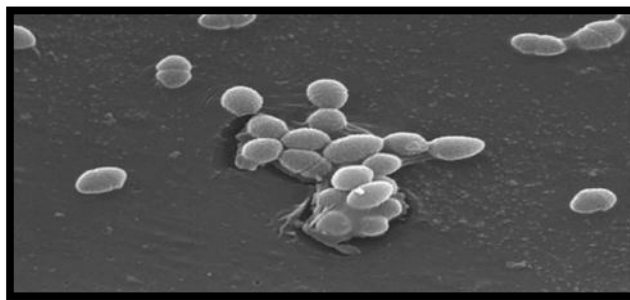


Figure 8 : Morphologie en microscopie électronique de *Enterococcus lactis* ssp

II.8.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

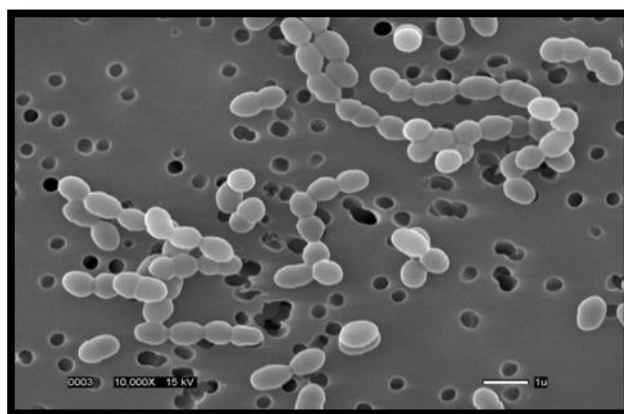


Figure 09 : Morphologie en microscopie électronique de *Leuconostoc* ssp.

II.8.6. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal.

Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de

l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007)

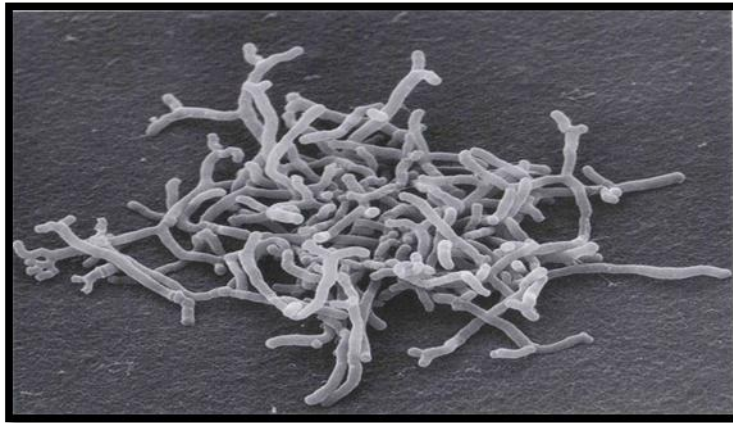


Figure 10 : Morphologie en microscopie électronique de *bifidobactérium longum ssp*

II.8.7. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

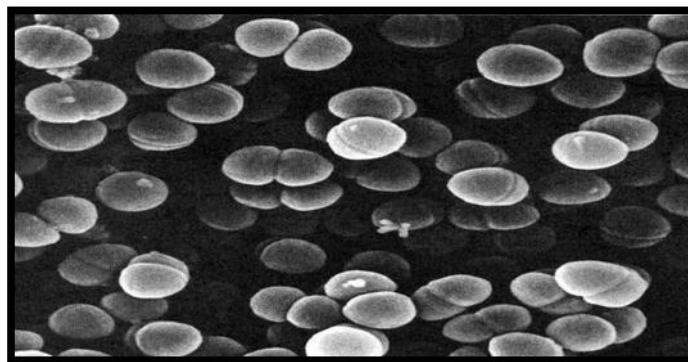


Figure 11 : Morphologie en microscope électronique de *Pediococcus ssp.*

II.9.Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont utilisées pour la fermentation des produits alimentaires depuis l'Antiquité. **Sont** les bactéries les plus importantes dans les fermentations alimentaires souhaitables, car elles sont responsables de la fermentation du pain à pâte aigre, des aliments et des boissons fermentés, les laits. Elles jouent un rôle essentiel dans la production de tous les produits laitiers et participe à la production de nombreux autres aliments et de saucisses, de cornichons, de boza, etc., et sont regroupées en fonction du produit final de la fermentation du glucose en deux types de fermentaires (**Wassie et Wassie, 2016**). Selon le mode de scission du squelette de carbone en trois voies principales de fermentation des hexoses les BL peuvent être divisées en deux groupes physiologiques :

- homofermentaire (Lactococcus lactis, L. delbrueckii, et L. casei)
- hétérofermentaire (L. amylovorus, L. reuteri, et L. manihotivorans).

Homo-fermentaires : métabolisent une molécule de sucre hexose tels que le glucose en deux molécules d'acide lactique et deux molécules d'ATP, ce qui permet d'obtenir plus de 85 % d'acide lactique à partir d'une molécule de glucose.

Hétéro-fermentaires : ne produisent que 50 % d'acide lactique en fermentant une molécule de glucose en une molécule d'acide lactique, une molécule de molécule d'éthanol/acétate, une molécule de CO₂, et une seule molécule d'ATP.

Le rapport acétate/éthanol dépend du potentiel d'oxydoréduction du système et La différence dans la production d'acide et le changement de pH pourrait servir de base à la différenciation de ces deux groupes de BL (**Hayek et Ibrahim, 2013**). Leur capacité de fermentation permet d'améliorer la sécurité alimentaire, les attributs organoleptiques, l'enrichissement en nutriments et les avantages pour la santé (**Wassie et Wassie, 2016**).

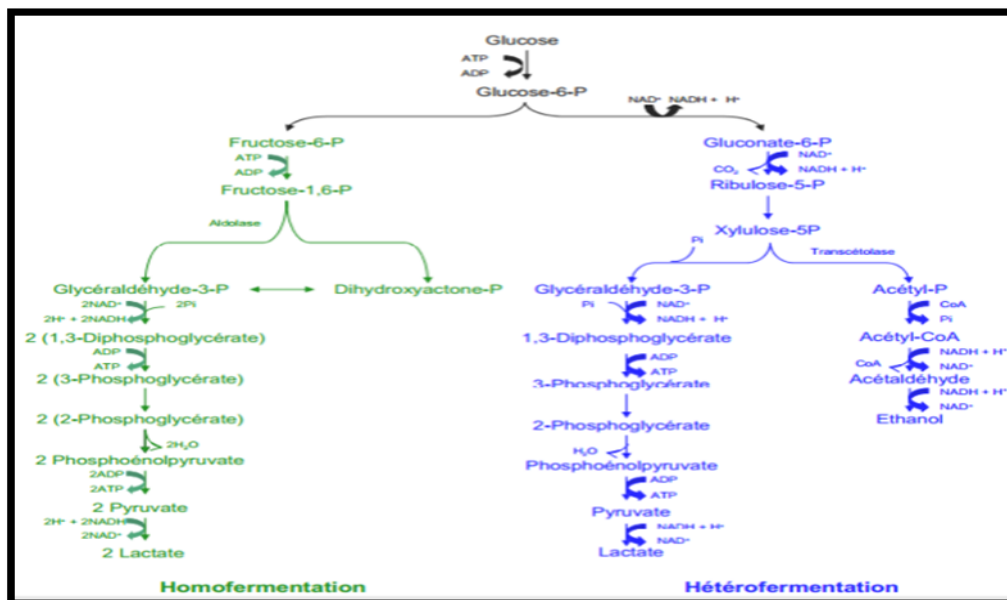


Figure 12 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, s. d, 2011).

Tableau 4: type fermentaire des bactéries lactiques (Dilmi Bouras ,1991).

Genre	Type de fermentation	Produit principale
<i>Streptocoques fécaux</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Pedicoccus</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate
	Hétérofermentaire	Lactate et acétate (1 :1)
<i>Betabacterium</i>	Hétérofermentaire	Lactate, CO ² et acétate (1 :1 :1)
<i>Lleuconostoc</i>	Hétérofermentaire	Lactate, CO ² et acétate (1 :1 :1)

II.10. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :

II.10.1. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008**). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (**Béal et al., 2008**):

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux.

II.10.2. Aptitude protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009**).

II.10.3. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al., 2008**).

II.10.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate,

des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006**).

II.10.5. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007**).

II.10.6. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al., 2005**). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes (**Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006**).

II.11. Utilisation des bactéries lactiques

II.11.1. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine(s) :

Parmi les propriétés métaboliques à intérêts technologiques attribuées aux bactéries lactiques est la production de bactériocines qui sont substances antagonistes de germes Indésirables ou pathogènes, elle est importante car ces antimicrobiens pourraient être une alternative aux conservateurs chimiques. La nisine est la première bactériocine autorisée en industrie alimentaire. D'autres bactériocines font l'objet d'études pour des applications en industries agro-alimentaires (**N-E, s. d**).

Les bactéries lactiques sont reconnues comme sûres (GRAS) par "la Food and Drug Administration américaine". En raison de leur sécurité prouvée et leur puissance antagoniste contre divers microbes d'altération des aliments et bactéries pathogènes,

ces bactériocines ont attiré une plus grande attention et ont été utilisées comme agents de conservation naturels dans l'industrie alimentaire. Cette révolution a conduit à la découverte d'un répertoire de bactériocines et de technologies de conservation permettant de les utiliser dans une série de matrices alimentaires. Ces bactériocines se distinguent des antibiotiques en ce sens qu'elles ne nécessitent pas de système multi-enzymatique pour leur synthèse, contrairement à ces derniers. En outre, les bactériocines sont très efficaces à très faible concentration et la plupart des bactériocines bien caractérisées, dont l'innocuité est prouvée, ne présentent pratiquement aucune toxicité ou effet secondaire provoquant des interactions indésirables comme celles des antibiotiques (**Johnson et al., 2018**).

II.11.2. Utilisation des bactéries lactique comme des probiotiques

II.11.2.1. Définition des probiotiques

Les probiotiques sont des "micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en nombre suffisant confèrent un bénéfice pour la santé à l'hôte (**Rodríguez et al., 2010**). Autre définition du probiotiques a été proposée en **2001 par Schrezenmeir et De Verse**"une préparation ou un produit contenant des micro-organismes viables, définis, en nombre suffisant, qui modifient le microflore par implantation ou colonisation, dans un compartiment de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte" Les micro-organismes, pour être classés comme souches probiotiques, doivent être définis précisément en déterminant des critères appropriés concernant la sécurité de leur utilisation et leurs caractéristiques fonctionnelles et technologiques. Les micro-organismes, candidats à l'appellation "probiotiques", doivent répondre à trois exigences essentielles :

- ✚ Ils doivent être vivants au moment de l'administration et doivent être des micro-organismes.
- ✚ Ils doivent être administrés à une dose suffisamment élevée pour avoir un effet bénéfique sur la santé. La dose efficace recommandée est strictement liée à la documentation clinique sur laquelle elle doit être basée.
- ✚ Les micro-organismes administrés doivent avoir un effet bénéfique sur L'hôte.

II.11.2.2. Application des probiotiques

Les probiotiques doivent être identifiés au niveau de la souche et être sûrs pour l'utilisation chez l'homme. C'est pourquoi ils doivent provenir du tractus gastro-intestinal d'un individu sain et être résistants aux enzymes gastriques, au faible pH et à la forte concentration de sels biliaires **(Zielińska et Kolożyn-Krajewska ,2018)**.

Les aliments probiotiques contenant des bactéries lactiques (LAB) ont été utilisés dans le traitement de divers troubles gastro-intestinaux, tels que les ulcères gastriques et les inflammation liés à l'infection par *H. pylori*, les infections gastro-intestinales ou la diarrhée associée aux antibiotiques , en fournissant des effets bénéfiques pour l'hôte en modulant les fonctions immunitaires, par exemple la production de cytokines systémiques **(Rodríguez et al., 2010)**.

Les bactéries lactiques présentes dans le lait de chèvre peuvent avoir un rôle potentiel dans la lutte contre le cancer. Ces bactéries lactiques peuvent également agir comme des probiotiques et être prises comme un complément alimentaire sur une base régulière .le lait de chèvre contient environ 61 % de bactéries lactiques hétérofermentaires et 39% d'entre elles ont des caractéristiques homofermentaires **(Bhartimittu ,2015)**.

Chapitre III : les bactériocines

III. Les bactériocines « les inhibiteurs spécifiques » des bactéries lactiques

III.1. Généralités sur les bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes*. L'application des bactériocines ou des souches productrices dans les aliments pour y éviter le développement de bactéries pathogènes ou altérantes a donc été envisagées (**Carine Dortu et Thonart ,2009**).

Les bactériocines ont une très grande importance car elles peuvent être utilisées pour la bio-préservation, Elles ont aussi le potentiel d'être utilisées comme antibiotiques, exploitées dans le domaine de la santé animale et de l'environnement marin (**Kaškonienė et al., 2017**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques présentent plusieurs avantages. En effet, elles permettent aux bactéries lactiques bactériocinogènes d'exercer un effet compétitif pour l'accès aux nutriments dans les écosystèmes naturels qui regroupent une diversité de microorganismes. Elles présentent un intérêt certain pour l'homme, notamment pour la conservation des aliments, mais également pour être utilisées comme alternatifs aux antibiotiques ou en association avec les antibiotiques naturels (**Kassaa ,2019**).

III.2. Historiques des bactériocines

L'histoire de la bactériocine remonte aux années 1920. En 1925, Gratia a découvert qu'il existait un antagonisme entre les souches d'*Escherichia coli*, qu'il pensait être causée par une substance produite par la souche d'*E. coli*. Il a ensuite isolé le métabolite de la souche. Il semblait qu'il s'agissait d'une substance semblable à un phage, qui a alors été nommée colicine. Plus tard, il a été découvert que non seulement les bactéries gram-négatives mais aussi de nombreuses bactéries gram-positives peuvent produire des substances similaires. Donc ces substances sont connues sous le nom de bactériocines (**Zhang, 2019**).

En 1988 Klaenhammer a définies les bactériocines comme des protéines ou des complexes de protéines avec une activité bactéricide dirigée contre espèces qui sont généralement étroitement liées à la bactérie productrice" (**Duhan et al., 2013**).

III.3.Définition

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action . Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries **Gram +** . Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries **Gram -** n'a été décrite, la membrane externe des bactéries **Gram-** ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Carine Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactériocines sont des métabolites protéiques présentant une activité antimicrobienne excrétés par différents groupes de bactéries .De nombreuses bactéries lactiques sont capables de produire des bactériocines. Plus de 230 bactériocines provenant de bactéries lactique sont été isolées et rapportées, mais seulement la moitié d'entre elles ont été identifiées au niveau des protéines ou de l'ADN (Alvarez-Sieiro et al.2016). La nisine est la bactériocine la plus populaire et la plus étudiée.la plus populaire et la plus étudiée, probablement en raison de son approbation en tant Qu'additif alimentaire (Code E234) depuis 1969 (**Kaškonienė et al., 2017**).

III.4.Nature

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leurs spectres d'action et de leurs modes d'action. Une bactériocine est généralement un composé protéique de 20 à 60 acides aminés. Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés antibiotiques car elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (**Taale et al., 2016**).

Les bactériocines sont des substances naturelles de nature protéique, produites par des micro-organismes et qui présentent une activité bactéricide ou bactériostatique (Boyaval et al., 1998).

III.5. La classification des bactériocines

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines de bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle au cours des dix dernières années. Leur classification est essentiellement fondée sur des données structurales (Luquet et Corrieu, 2005).

Tableau 5 : La classification des bactériocines de bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2005).

Classes	Sous-catégories
Classe 1 : lantibiotiques	Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires
Classe 2 : bactériocines non-modifiées, thermostables	Classe IIa : anti- <i>Listeria</i> Classe IIb : bactériocines à deux composants Classe IIc : autres bactériocines
Classe 3 : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur	

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène d'inhibiteurs peptidiques comprenant lantibiotiques (classe I, par exemple la Nisine), de petits peptides thermostables (classe II, par exemple la pédiocine AcH/PA1) et de gros protéines thermolabiles (classe III, par exemple l'helvéticine J). De nombreuses appartenant aux deux premiers groupes peuvent être utilisées avec succès pour inhiber les micro-organismes indésirables dans les aliments, mais seule la Nisine est produite industriellement et est autorisée comme conservateur alimentaire sous une forme partiellement purifiée (De Vuyst et Leroy, 2007). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

III.5.1. Classe I. Lantibiotiques

Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à (< 5 kDa), stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

La structure des lantibiotiques varie essentiellement en fonction de la localisation de ponts établis entre les acides aminés modifiés, ce qui permet de distinguer :

1. les types A (lantibiotiques linéaires)
2. les types B (lantibiotiques globulaires) (**Carine Dortu et Thonart ,2009**).

- Lantibiotiques de type A

Le type A rassemble les lantibiotiques linéaires et cationiques structurés en hélice – amphiphile et de masse moléculaires (< 4kDa). Ces peptides présentent des similitudes d'arrangements de leurs ponts « lanthionine ». Ces bactériocines sont principalement synthétisées par les genres *Lactococcus* , *Lactobacillus* , *Streptococcus* et également par des genres n'appartenant pas aux bactéries lactiques comme *Staphylococcus* ou *Bacillus* (**Carine Dortu et Thonart, 2009**).

- Lantibiotiques de type B

Les lantibiotiques de type B sont des peptides de 1,8 à 2,1kDa adoptant une structure globulaire et plus rigide que celle des peptides de type A et une charge globalement nulle ou négative. Ces molécules agissent en inhibant certaines enzymes comme celle intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette sous-classe de lantibiotique regroupe les duramycines et leurs variants naturels (l'ancovénine et cinnamycine). La mersacidine , l'actagardine et la mutacine A (**Luquet et Corrieu, 2005**).

- Autres lantibiotiques

Les lantibiotiques à deux composants comme la cytolysine , la lacticine 3147 et la plantaricine W .Certains de ces lantibiotiques à deux composants montrent des peptides s'apparentant à chacun des types A et B , ce qui rend difficile leur

important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Carine Dortu et Thonart ,2009),les bactéries lactiques productrices de bactériocines de classe IIa sont isolées de produits alimentaires comme le lait, les charcuteries et divers produits fermentés. D'autres sources et environnements comme les fèces d'animaux d'élevage, les eaux usées et les sécrétions vaginales recèlent des bactéries lactiques productrices de bactériocines de classe IIa (Kassaa, 2019).

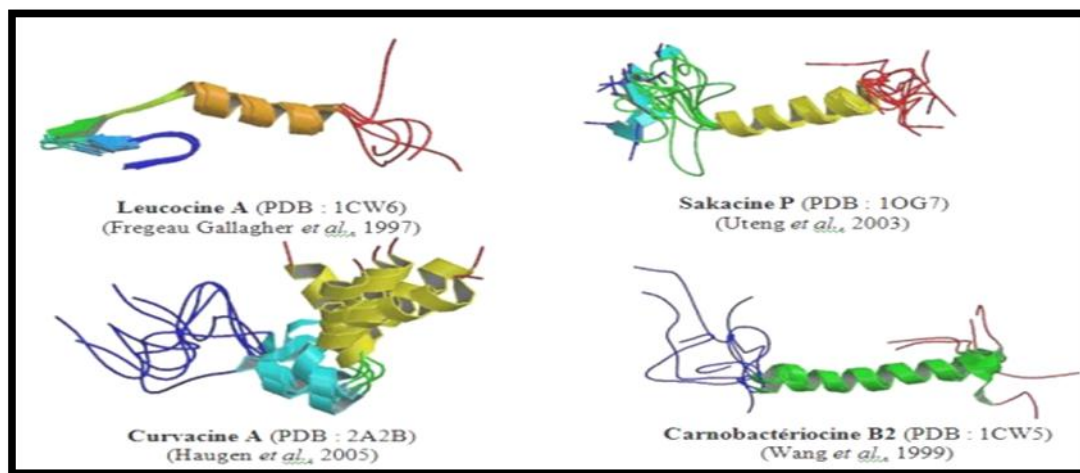


Figure 14 : Structures tridimensionnelles de quelques bactériocines de classe IIa.

- **Les bactériocines de la sous-classe IIb**

Les bactériocines de la sous-classe IIb comprennent la lactacine F et la lactococcine G. Les lactacines F et G sont des bactériocines à deux composants. deux peptides distincts agissent en synergie pour générer un effet antimicrobien. (Negash et Tsehai 2020).Comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

- **Les bactériocines de La sous-classe IIc**

La sous-classe IIc contient des bactériocines circulaires telles que la gassericine A, la circularine A et la carnocycline A .carnocycline A . Ces peptides portent deux segments transmembranaires qui facilitent la formation de pores.qui facilitent la formation de pores dans les cellules cibles (**Negash et Tsehai ,2020**),.Cette classe contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (**Dortu et Thonart ,2009**).

III.5.3. Classe III.Protéines

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines :l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (**Carine Dortu et Thonart ,2009**).

III.5.4. Classe IV. Bactériocines complexes

Les bactériocines de classe IV étaient définis comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et / ou oligosaccharidique, nécessaire à leur activité biologique. La plantaricine S, par exemple, possède une activité antibactérienne sensible à des enzymes lipolytiques et glycolytiques .Cette classe présentée par Klaenhammer (1993) a été contestée par la suite par de nombreux auteurs, puisque aucun de ces peptides n'a été copurifié avec sa partie glucidique ou lipidique.Cette classe ne sera pas prise en compte dans le système de classification (**Luquet et Corrieu 2005**).

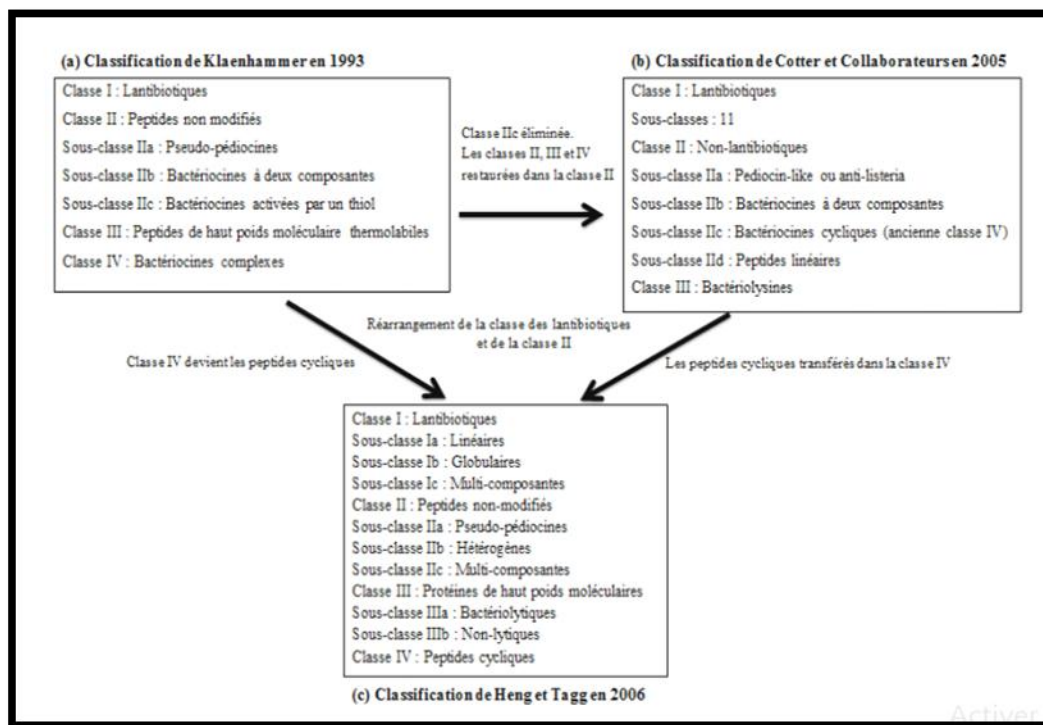


Figure 15 : Classification universelle des bactériocines reprise avec quelques modifications. (a) Classification proposée par Klaenhammer (1993), (b) Classification proposée par Cotter et al. (2005) et (c) Classification proposée par Heng et Tagg (2006) (Taale et al., 2016).

III.6. Production et conditionnement des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture.

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement :

1. la souche productrice
2. la température
3. le pH
4. la composition du milieu
5. la technologie de fermentation employée
6. La composition du milieu

Les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et

des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines. D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines. L'ajout de ces nutriments lors d'une culture *fed-batch* permet souvent d'augmenter la production et l'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la Lacticine 3147 et la Nisine (**Carine Dortu et Thonart, 2009**).

III.7. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation. La Nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (**C. Dortu et Thonart, 2009**).

III.8. Organisation génétique des bactériocines

Toutes les bactériocines sont produites par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice sous forme d'un précurseur inactif appelé prébactériocine reconnu par le transporteur. Le peptide « signal » ou « leader » permet la sécrétion de la bactériocine dans le milieu extérieur et protège la bactérie contre l'action de sa propre bactériocine. Les gènes impliqués dans la production des bactériocines sont généralement organisés sous forme d'opéron et les gènes de structure et les gènes d'immunité sont généralement cotranscrits. Les éléments nécessaires au transport de la bactériocine synthétisée sont généralement trouvés sur un autre locus. De plus, un troisième locus codant pour un système de transduction du signal peut être identifié. Ce système à deux ou trois composants permet l'induction de la production du peptide

antibactérien Cette production est souvent régulée par un **système de Quorum Sensing (Taale et al., 2016)**.

III.9.les mécanismes d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries **Gram -** . Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**C. Dortu et Thonart ,2009**).

Les mécanismes d'action des bactériocines peuvent être divisés en deux grandes catégories ceux qui fonctionnent principalement au niveau de l'enveloppe cellulaire et ceux qui sont actifs principalement à l'intérieur de la cellule, en affectant l'expression génétique et la production de protéines (**Cotter, Ross, et Hill ,2013**).

Le mode d'action des bactériocines sur une bactérie cible se fait par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal. Les bactériocines peuvent avoir un effet bactériostatique ; un effet bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique (pas de lyse cellulaire) et un effet bactériolytique qui conduit à une dissolution de la cellule bactérienne.L'état physiologique de la bactérie productrice et les conditions expérimentales (concentration et pureté de la bactériocine, concentration de la cellule cible et milieu de culture) peuvent influencer l'action des bactériocines. Le mode d'action diffère d'une bactériocine à une autre. Par contre, le mécanisme d'action des bactériocines se décompose en trois étapes :

- la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible (durant cette étape le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité).
- l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique avec recrutement de plusieurs peptides antibactériens pour former un pore.
- la formation de pores conduisant aux fuites de composés intracellulaires vitaux Cette perte entraîne des effets néfastes pour la cellule cible, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (**Taale et al., 2016**).

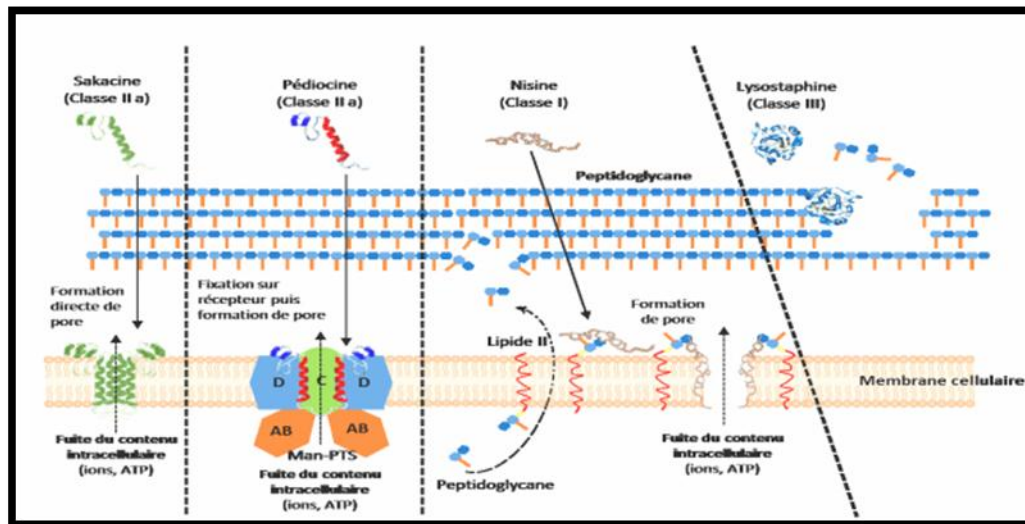


Figure 16: Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par Fernandez (2014) et repris ici sans modifications (Taale et al., 2016).

III.9.1. Le mécanisme d'action des antibiotiques et bactériocines de classe II et la classe III.

Certains membres de la classe I (bactériocines lantibiotiques), comme la Nisine, ont un double mode d'action. Ils peuvent se lier au lipide II, le principal transporteur des sous-unités de peptidoglycane du cytoplasme vers la paroi cellulaire et par conséquent, empêcher la synthèse correcte de la paroi cellulaire, ce qui entraîne la mort cellulaire. En outre, ils peuvent utiliser le lipide II comme molécule d'amarrage pour initier un processus d'insertion membranaire et de formation de pores qui conduit à une mort cellulaire rapide. Un lantibiotique à deux peptides, comme la lacticine 3147, peut avoir ces deux activités réparties sur deux peptides, alors que la mersacidine n'a que l'activité de liaison au lipide II, mais ne forme pas de pores.

Les peptides de classe II ont une structure hélicoïdale amphiphile, qui leur permet de s'insérer dans la membrane de la cellule cible, entraînant une épolarisation et la mort. De grandes protéines bactériolytiques, anciennement des bactériocines de classe III appelées bactériolysines, comme la lysostaphine, peuvent agir directement sur la paroi cellulaire de cibles Gram-positives, entraînant la mort et la lyse de la cellule cible (Cotter et al., 2005).

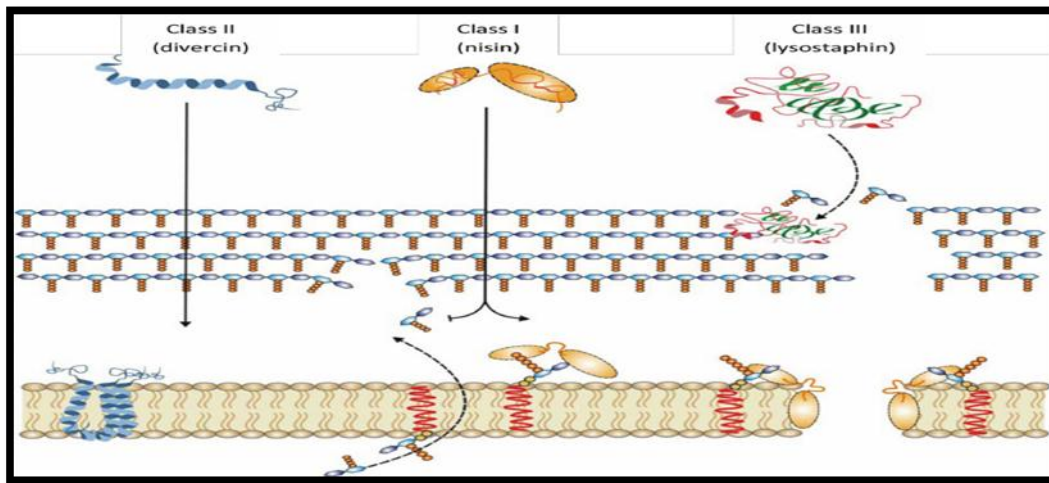


Figure 17 : le mécanisme d'action de bactériocines (Cotter *et al.*, 2005).

III.10. Comparaison entre les bactériocines et les antibiotiques

Un grand nombre de bactéries Gram (+) et Gram négatif (-) produisent, au cours de leur croissance, des substances de structure protéique soit des protéines, soit des polypeptides possédant des activités antimicrobiennes, appelées bactériocines. Bien que les bactériocines puissent être classées comme des antibiotiques, elles ne le sont pas. La principale différence entre les bactériocines et les antibiotiques est que les bactériocines limitent leur activité aux souches d'espèces apparentées à l'espèce productrice et particulièrement aux souches de la même espèce. Les antibiotiques, en revanche, ont un spectre d'activité plus large et, même si leur activité est limitée, ils n'ont pas d'effet préférentiel sur les souches étroitement apparentées. Effet préférentiel sur les souches étroitement apparentées. En outre, les bactériocines sont synthétisées par les ribosomes et produites pendant la phase primaire de la croissance, alors que les antibiotiques ont un spectre d'activité plus large. phase primaire de la croissance, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires (Zacharof *et Lovitt*, 2012).

Les bactériocines ont une nature synthétisée par un ribosome, tandis que les antibiotiques sont produits par des complexes d'enzymes multiples. Les bactériocines présentent souvent des effets bactéricides ou bactériostatiques sur un spectre étroit de bactéries, alors que les antibiotiques traditionnels ont un spectre plus large. En outre, la plupart des bactériocines sont plus efficaces contre leurs bactéries cibles que les antibiotiques à des concentrations plus faibles. Les bactériocines sont souvent considérées comme plus naturelles parce qu'elles car elles sont censées avoir été présentes dans de nombreux aliments consommés depuis les temps anciens. Les

bactériocines sont inactivées par les enzymes, telles que la trypsine et la pepsine, présentes dans le tractus gastro-intestinal et n'altèrent donc pas le microbiote du tube digestif (Negash et Tsehai ,2020).

III.11. Les applications des bactériocines

Ces dernières décennies, les bactériocines compte tenu de leur innocuité, ont connu plusieurs applications dans l'agro alimentaire et en médecine.

III.11.1. application des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*. Elles peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait. Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja (C. Dortu et Thonart ,2009).

Tableau 6 : Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments (Taale et al., 2016).

Application	Bactériocine	Classe	Effet
Dans les produits laitiers	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores de <i>Clostridium botulinum</i> et la contamination
	Lacticine 3147	I	par <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage.
	Pédiocine PA-1/AcH	IIa	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>Staph. aureus</i>

- Hygiène dentaire (chewing-gum composition contient des bactériocines des agents anti-bactériens)
- Dans les compositions des dentifrices, et les lingettes désinfectants.
- Applications des bactériocines dans le secteur de cosmétique (**Luquet et Corrieu, 2005**).

III.12. Impact économique des bactériocines

La commercialisation de la nisine occupe la part la plus importante car elle est à ce jour la seule bactériocine autorisée par la FAO à être utilisée comme additif alimentaire. Ces dernières années, la production et la commercialisation des différentes bactériocines ont atteint des valeurs records car en suivant le taux de croissance annuel ; aujourd'hui, on atteint un chiffre d'affaire de plus de 50 milliards de dollars US. Les principales sociétés productrices sont : Danisco A/S (Danemark), Royal DSM (Hollande), Kerry Group Plc (Irlande), Rhodia S.A. (France), SyscoFoods (USA), Schreiber Foods (USA), etc. L'utilisation des halocines dans les industries du textile permet de limiter la croissance des organismes halophiles présents à cause de l'emploi massif de sel lors des procédés de tannage. Cette utilisation réduirait les coûts de production (**Taale et al., 2016**).

Matériel et méthodes



IV. Matériel et Méthodes

IV.1.L'objectif du travail

Les objectifs de cette étude s'articulent autour les points suivants :

- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir d'un produit laitier qui est le lait de chèvre dans la région de la wilaya de Sidi bel Abbes.
- L'étude des bactéries lactiques productrices des bactériocines par la réalisation de l'activité antagoniste sur les souches suivantes : *Escherichia-coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

IV.2.Lieu et période d'étude

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie générale dans le département de biologie, université de Djilali Liabes de sidi bel Abbes, durant la période de trois mois (avril – Juin) de l'année 2021.

IV.2.1.Provenance et collection d'échantillon

Les souches des bactéries lactiques utilisées dans notre étude ont été bien isolée a partir de l'échantillon qui est le lait cru de chèvre (Espèce : Capra de couleur noire) qui provient d'une ferme d'élevage située dans l'institut (L'itma) à Sidi bel Abbes Algérie.



Figure 18 : présentation de la race chèvre (Capra de couleur noire).

IV.2.2.Conditions de prélèvement de l'échantillon

- Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau puis séchage du pis, le lait a été recueilli dans des flacons stériles (100ml /flacon).
- Et transporter immédiatement, et ne dépassant pas 24h après le prélèvement.

- Les échantillons sont acheminés au laboratoire de microbiologie générale dans une glacière à 4°C, puis sont mis au réfrigérateur pour qu'ils soient utilisés ultérieurement, au maximum dans les 48h.



Figure 19 : La méthode de prélèvement d'échantillon à partir du lait de chèvre (Capra) de la région de Sidi bel Abbés.

IV.3. Matériels

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

IV.3.1 Matériel biologique

- **Echantillon** : lait cru de chèvre, les bactéries lactiques sont isolées directement à partir de ce lait
- **Souches indicatrices pour l'effet antagoniste** : Il s'agit de trois souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :
 - *Escherichia coli* ATCC 25922.
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire central du CHU à Sidi bel Abbés.

IV.3.2. Matériel non biologique

IV.3.2.1. Milieux et condition de cultures

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale étaient soit liquides soit solidifiés par addition d'agar à différentes concentrations, les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 15 min conservés à 4°C, il s'agit des milieux suivants :

- **Milieu MRS (selon Man, Rogoza, et Sharpe)** : milieu nutritif destiné à l'enrichissement, la culture et à l'isolement de toutes les espèces de *Lactobacilles*.
- **Milieu Mueller Hinton** : est une gélose riche, utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme standard il permet de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries.
- **Bouillon nutritif** : utilisé pour la croissance des germes.
- **Mannitol mobilité** : milieu de culture caractérisé par l'utilisation de Mannitol et permet de mettre en évidence (ou non) la mobilité bactérienne.

La composition des milieux de culture est mentionnée dans l'annexes1

IV.3.2.2. Produits chimiques et réactifs

- **Colorants** : Violet de Gentiane, fuschin, bleu de méthylène.
- **Acide et bases** : l'acide chloridrique (HCl), le chlorure de sodium (NaCl).
 - **Réactifs** : l'huile à immersion, l'huile de paraffine
- **Alcool et autres** : Ethanol, lugol, eau oxygénée (H₂O₂), alcool (70%), Eau distillée stérile, eau distillée, Eau physiologique, AGAR –AGAR
- **Sucres**: mannitol.

IV.3.2.3. Les Disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, cinq disques (laboratoire de microbiologie appliqué) ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de **Gentamicine (GEN 10µg)**, **Céphaléxine (CL 30 µg)**, **Lincomycie (LIN 1530 µg)**

IIV.4.Méthodes

IIV.4.1.Préparation de l'inoculum et l'isolement

Le lait cru de chèvre a été dans une première étape homogénéisé et dilué pour obtenir la prise d'essai destinée à être inoculée dans les différents milieux de culture.

IIV.4.2.Préparation des dilutions décimales

- Agiter pendant 10 secondes le flacon contenant l'échantillon du lait cru de chèvre à diluer.
- Prélever aseptiquement à l'aide d'une micropipette stérile 1 ml de la solution mère (1 ml de lait de chèvre).
- Introduire le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique.
- Agiter bien à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes.
- Transfère de 1ml du premier tube dans le deuxième, de la même façon des dilutions décimales successives sont effectuées jusqu'au 6^{ème} tube (10^{-6}).



Figure 20: la préparation des dilutions décimales

IIV.4.3.Isolement des bactéries lactiques

- L'isolement effectué le jour même de la réception des échantillons de lait dilué à partir des dilutions suivantes (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).
- L'ensemencement a été réalisé à partir des dilutions décimales mentionnées en surface des boîtes de pétri par la techniques d'étalement en stries.

- 3 boîtes pétris stériles sont utilisées pour chaque dilution ont étéensemencé sur milieu gélose MRS.
 - La gélose MRS a été coulée dans des boîtes pétries stériles, ces boîtes ont été bien fermées en utilisant le système (anaerocult + bougie) pour assurer l'anaérobiose qui aide au développement rapide des bactéries lactiques.
 - les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48h à 72h.

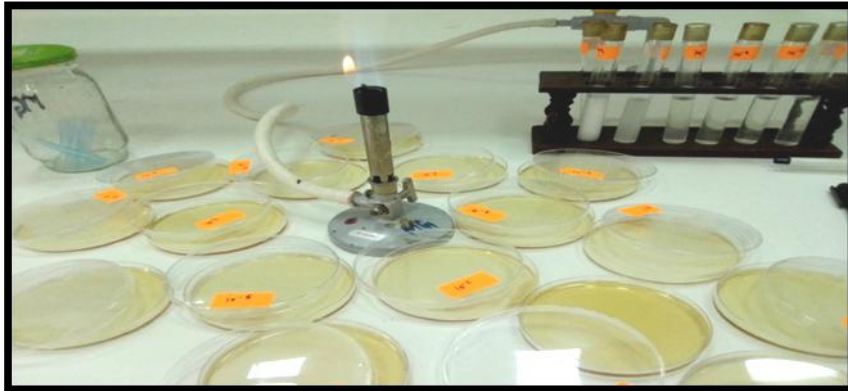


Figure 21 : Solidification de milieu MRS gélose inoculés dans les boîtes de pétri.

IV.4.4. Etape de l'enrichissement

Dans cette étape un volume de 1ml du lait de chèvre dilué a étéensemencé dans un tube à essai contient 5ml de bouillon MRS et incubés ensuite à 37 °C pendant 72h en condition d'anaérobiose.



Figure 22 : Enrichissement des bactéries lactique isolées et incubé dans une jarre.

IV.4.5. Purification des isolats de bactéries lactiques

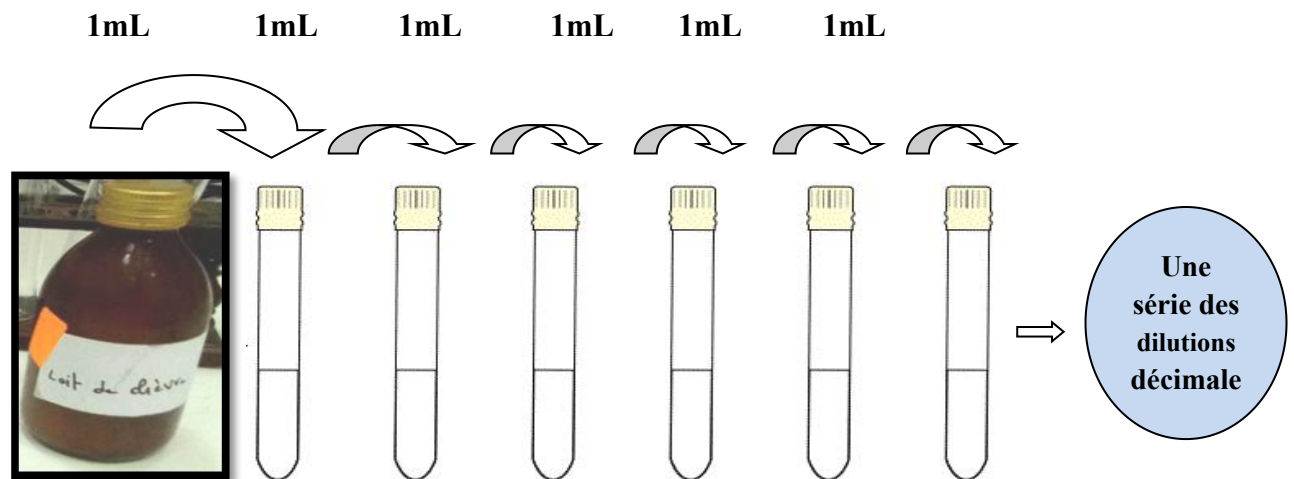
Après incubation 72h, les colonies obtenues ont été sélectionnées après :

- analyse macroscopique
- coloration de Gram pour définir la forme des cellules bactériennes (coques ou bacilles).
- Test de catalase

Seules ceux qui présentent un aspect typique des colonies de bactéries lactiques, et qui ont Gram + et catalase -, ont été présumées comme étant des bactéries lactiques, puis ils ont été mis dans des tubes contenant le bouillon MRS pour leur enrichissement.

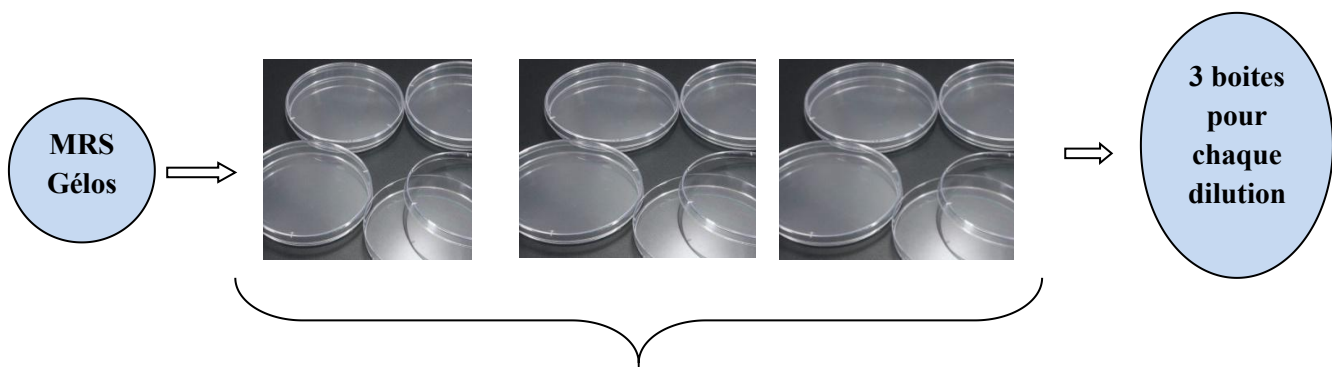
Afin de purifier les souches obtenues :

- Des repiquages successifs sont effectués sur le MRS gélose et le bouillon
- La purification des souches consiste à les ensemercer en stries sur les boîtes de pétri coulées avec des milieux MRS solide.
- Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h.



Lait cru de chèvre

Ensemencement 0.1 ml dans chaque boîte de pétri



Laisser les boîtes pour solidifier



Incubation des boîtes à 37 °C pendant (48h à 72h)
En anaérobiose Jarre + anaerocult

Figure 23 : schéma de la préparation et l'ensemencement des dilutions décimales

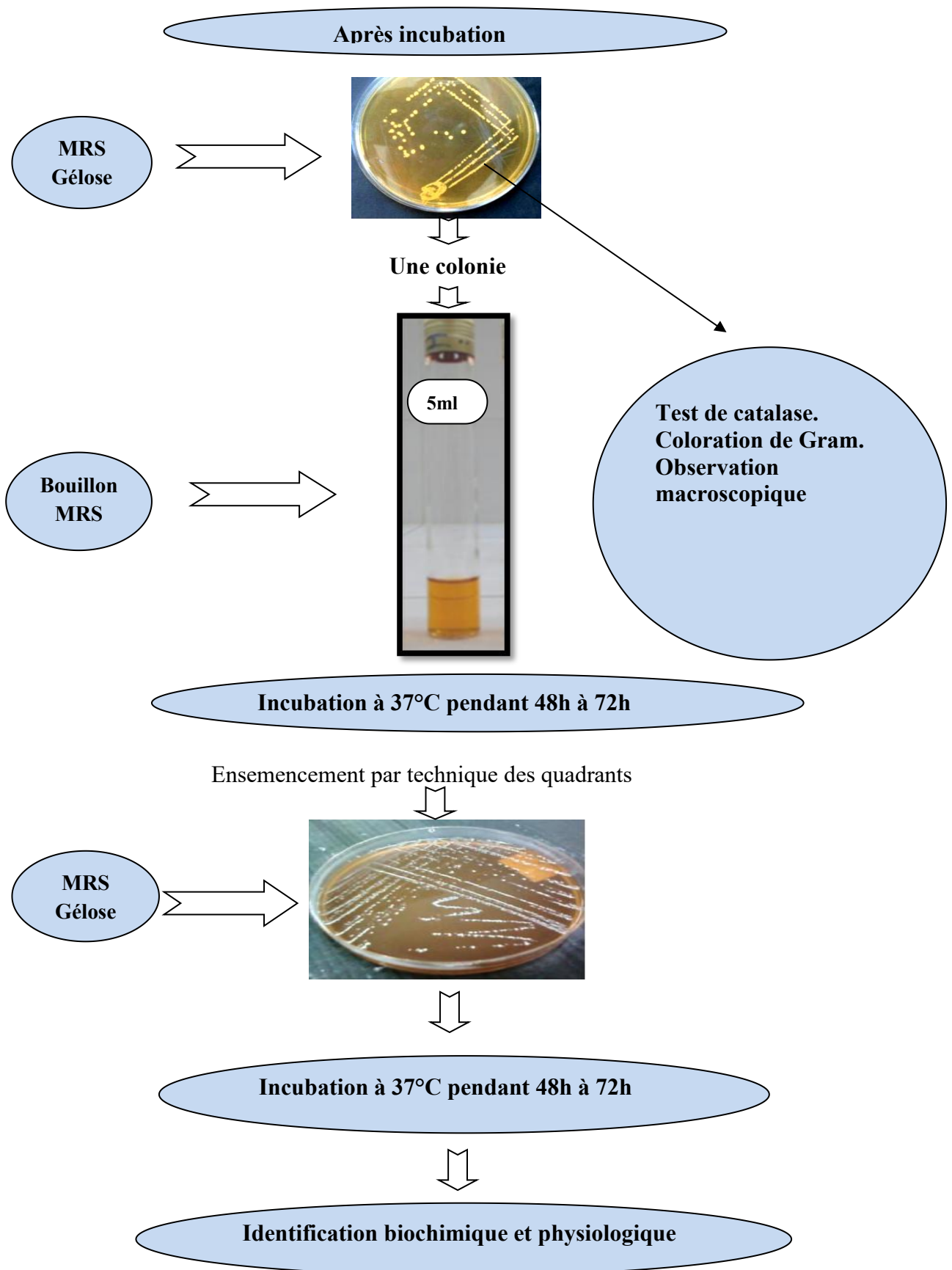


Figure 24 : Schéma représentative des étapes d'isolement et la purification des bactéries lactiques.

IV.5. Identification des souches: L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

IV.5.Caractérisation phénotypique des souches

IV.5.1.Examens macroscopique des cultures

L'examen macroscopique est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation 72h à 37°C en anaérobiose, les colonies obtenues sur les boites de pétris contenant du milieu MRS solide sont examinées (à l'œil nu). L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect de chaque colonie (sa forme et relief, sa taille, sa couleur, ses contours, sa texture, la pigmentation, la viscosité).

IV.6.Caractérisation morphologique des souches

Afin de déterminer la morphologie des cellules bactériennes et leur disposition, et à partir des colonies blanchâtres caractéristiques aux *Lactobacillus*, on réalise une coloration de Gram (**Larpen & Larpen-Gourgaud, 1997**) pour s'assurer de la présence de cellules à Gram positif et également pour noter leur morphologie et leur mode d'agencement.

Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques.

IV.6.1.La coloration de Gram

Se réalise sur des cultures jeunes de moins de 24h.

Principe

- Réaliser un frottis sur une lame en verre propre et préalablement dégraissée ;
- Colorer le frottis avec du violet de gentiane durant 2 minutes ;
- Rejeter le colorant et ajouter le Lugol 2× 45secondes.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 96° durant 10 secondes.
- Rincer abandonment à l'eau.
- Faire une contre-coloration avec de la fuchsine diluée à 1/10 durant 2 minutes.

- Rincer à l'eau et observer à l'immersion $\times 100$.

Lecture :

Les bactéries Gram positives apparaissent en violet alors que les Gram Négatives apparaissent en rose (**FUGLSANG et EDWARDS, 2007**).

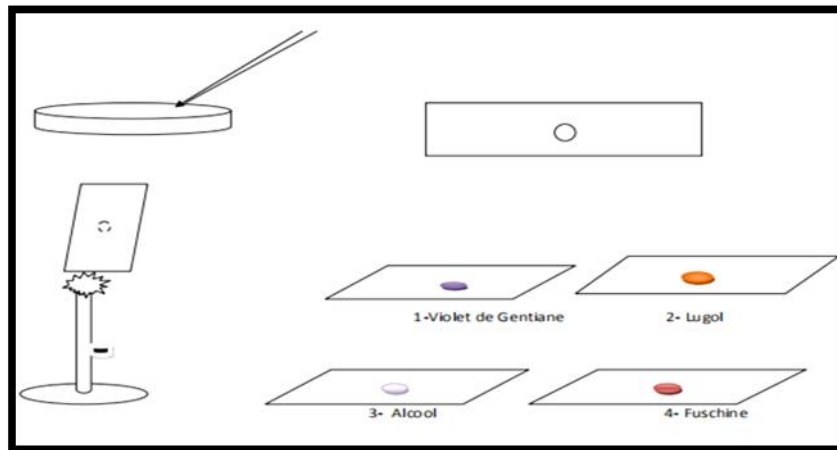


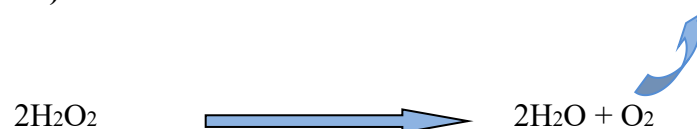
Figure 25 : les étapes de la coloration de Gram

IV.7. Caractérisation biochimiques

L'étude des caractères biochimiques est basée essentiellement sur la recherche d'oxydase, de catalase.

IV.7.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme retrouvée chez la plupart des bactéries aérobies strictes et Anaérobies facultatives. En effet, En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée qui est un composé cellulaire toxique Cette, empêche l'accumulation de cette eau oxygénée en la décomposant en eau et en oxygène (**DELARRAS, 2007; FUGLSANG et EDWARDS, 2007**).



Technique

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volume) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie.

Lecture

La souche est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme catalase.

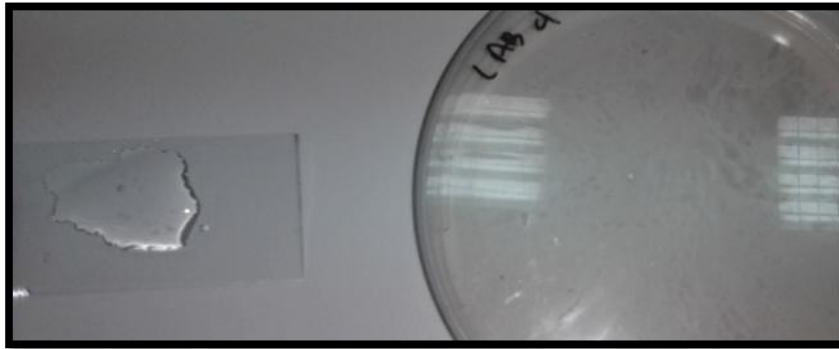


Figure 26 : Réalisation de test de catalase

IV.7.2. Test oxydase

Principe

Ce test permet la recherche du cytochrome oxydase qui est la dernière enzyme de la Chaîne respiratoire (la phénylène diamine oxydase). Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif: le N diméthyle paraphénylène diamine (LEVEAU *et al.*, 1991).

Technique

Sur un tube stérile, déposer un disque oxydase et l'humidifier avec quelque goutte d'eau distillée stérile, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, prendre une colonie et la déposer sur le disque.

Lecture

Le changement de couleur indique le résultat positif, si le disque prend une couleur violette l'oxydase est positive, si le disque reste incolore l'oxydase est négative. Seules les souches à Gram positif, catalase et oxydase négatif ont été retenues.

IV.7.3. Type fermentaire

Principe

C'est un test qui permet de séparer les espèces bactériennes homo-fermentaires et des bactéries hétéro-fermentaires.

Technique

Nous réaliserons la technique à la cloche de Durham, nous utiliserons le bouillon MRS et nous procédons comme suite :

- Remplir des tubes à essai à vis renfermant la cloche de Durham de 10 ml du bouillon MRS
- Ensemencer avec l'isolat correspondant et homogénéiser en évitant l'introduction de bulles d'air dans la cloche.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24h à 48h.

Lecture :

- Bactéries homofermentaires : absence de bulles de gaz dans la cloche.
- Bactéries hétérofermentaires : présence de bulles de gaz dans la cloche.
(LEVEAU *et al.*, 1991).

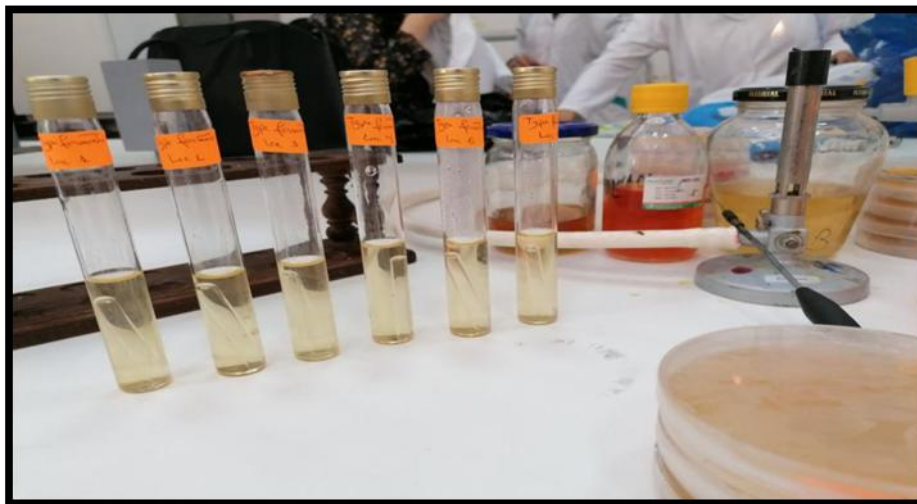


Figure 27 : Réalisation de test de type fermentaire des bactéries lactiques.

IV.8.Caractérisation physiologiques

Les souches isolées ont été testées à différents conditions hostiles pour vérifier leur résistance à ces conditions qui sont les suivants :

IV.8.1.Test de Mannitol-mobilité

Ce test est réalisé sur milieu de mannitol-mobilité , permet de rechercher la fermentation du mannitol et de vérifier la mobilité de germes .Le mannitol est un produit de réduction du mannose .La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit

à la formation du fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (Guillaume,2004).

Technique

- Remplir des tubes à essai avec le milieu mannitol-mobilité.
- A l'aide d'une anse de platine le milieu mannitol est ensemencé par une piqure centrale contenant les isolats bactériennes.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité des germes.

Lecture

Les bactéries immobiles se développent uniquement au long de la piqure centrale tandis que les bactéries mobiles envahissent le tube de part et d'autre (GUIRAUD, 2003; LEVEAU et al. 1991).



Figure 28 : Réalisation de test de Mannitol-mobilité sur les bactéries lactiques.

IV.8.2. Test de Croissance à différentes températures

L'aptitude à la culture est testée à 30°C, 37°C et à 45°C en ensemencant des tubes de bouillon MRS. Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al, 1991). Les tubes sont examinés au bout d'un délai de 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

IV.8.3. Thermorésistante à 62°C pendant 30 minutes :

Ce test permet d'isoler ou identifier les souches résistantes à une température de 62°C pendant 30 minutes.

Technique

- Pour chaque souche, ensemencer 300µl de la solution bactérienne dans un tube du Bouillon MRS (5 ml) ;
- Le placé dans un bain-marie à 63°C pendant 30 minutes ;
- Refroidir immédiatement sous le robinet et incubé à 37 °C pendant 48h.

Lecture

L'apparition d'un trouble implique la poussée de la souche et donc la thermorésistante

IV.8.4. Test de croissance en différents pH: (pH=3 ; pH=4.5 ; pH=7 ; pH=9)

Ce test est réalisé uniquement pour les cocci en milieu MRS solide dont le pH est ajusté à 3, 4.5, 7, 9. Ensemencement de chaque souche sur boîte pétri en culée sur milieu MRS et incubée en anaérobiose à 37°C pendant 24 à 48h.

IV.8.5. L'effet d'oxygène

Le principe de ce test est de tester l'effet d'oxygène sur la croissance des bactéries lactiques, et de voir si les bactéries lactiques exigent la présence d'oxygène ou non.

La technique

Ensemencement en surface de chaque souche sur une boîte pétri coulées en MRS gélose et incubée en suite en aérobiose à 37°C pendant 24h à 48h.

IV.9. Test de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme) :

Principe

La culture permet aussi d'étudier la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques. Cette sensibilité a été testée par la méthode de diffusion (méthode de disques) sur les milieux (Muller-Hinton et MRS solide) en utilisant plusieurs antibiotiques.

Technique

- Coulée la gélose Muller- Hinton, et la gélose MRS dans des boîtes pétri
- Laisser sécher les boîtes de pétri contenant les milieux à la température de laboratoire
- Les boîtes sont ensemencées par une suspension bactérienne par inondation, sur lesquelles sont disposés les disques d'antibiotiques.

- Chaque boîte reçoit (2 à 3) disques d'antibiogramme (Gentamicine (GEN 10), Céfalexine (CN 30), Lincomycine (LIN 15)).
- L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 heures en anaérobiose.

Lecture

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue provoquée par l'antibiotique. Après incubation à 37 C° pendant 24h Le classement des isolats bactériennes en 3 catégories (Sensible (S) ; Résistante (R) ; Intermédiaire (I)) se fait selon les diamètres des halos d'inhibitions.

IV.10. TEST DE L'ANTAGONISME (LA RECHERCHE DES BACTÉRIOCINES)

IV.10.1. Mise en évidence de la production de bactériocines

Le but de notre étude, est de mettre en évidence l'effet antagoniste des souches de bactéries lactiques que nous avons isolé par l'action de bactériocines ; ce qui nous conduit à travailler dans des conditions expérimentales éliminant l'effet conjugué des acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (DACOSTA, 2000 ; YAAKOUBI et *al.*, 2006) :

- Élimination de l'effet de l'acidité par la neutralisation du pH
- Élimination de l'effet du peroxyde d'hydrogène par la création de la condition d'anaérobiose.

Pour la mise en évidence de la production de bactériocines, les 06 souches de bactéries lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par puits décrite par TAGG et McGiven en 1971 et la méthode des disques.

IV.10.2. La méthode de diffusion en puits

Principe

La recherche de la substance inhibitrice dans le milieu extracellulaire de l'isolat producteur est l'élimination de l'effet du pH et du H₂O₂.

Technique

Pour réaliser le test d'antagonisme par la méthode de diffusion en puits, il faut avoir des pré-cultures des souches lactiques et le pré culture de la souche indicatrice

(Pathogène).

- À partir des tubes inclinés de gélose MRS, nous avons ensemencé chacune des 6 souches lactiques isolées dans un tube à essais contenant 5 ml du bouillon approprié (bouillon MRS). Le Tube est incubé à 37°C pendant 18 heures en anaérobiose.
- La pré-culture des souches indicatrices : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ont été ensemencé dans des tubes de bouillon nutritifs et incubée pendant 18 heures.
- Inoculer la gélose de (Muller Hinton et MRS solide) dans des boites pétri et fondue et refroidie à 45°C.

Après solidification, les boites sont ensemencées à l'aide d'écouvillon par la souche test.

- Des puits sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce ou un embout, puis remplis par (100µl) de surnageant brut de la culture lactique à tester préalablement stérilisé par filtration sur membrane de la culture à tester.
- Les boites sont incubées pendant 24h à 37°C.

Lecture

L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Celles que sont entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2mm sont considérées comme positive.

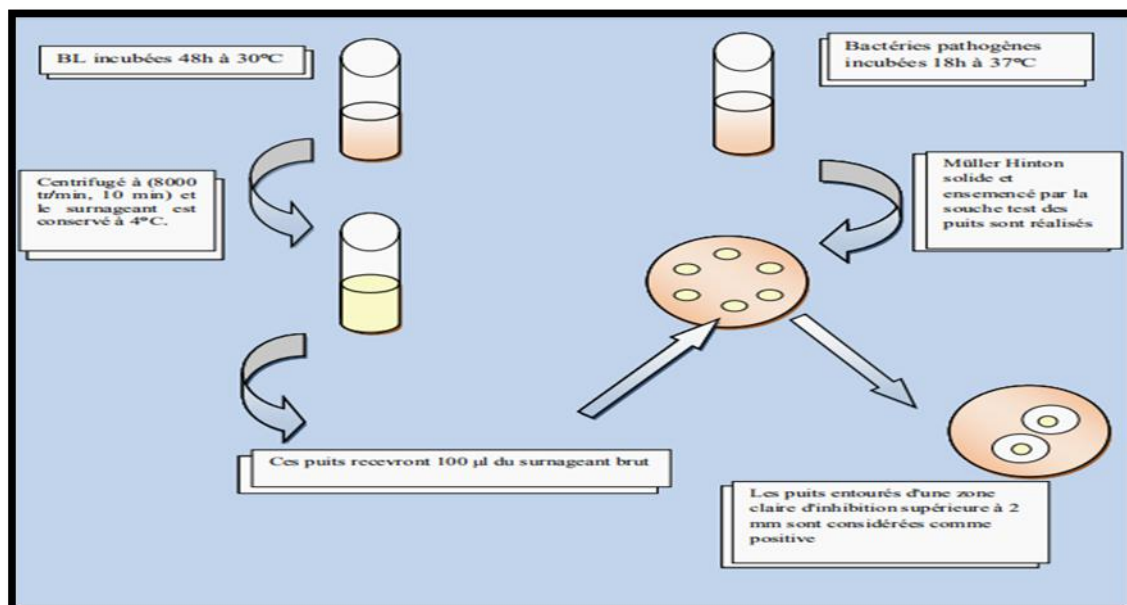


Figure 29 : digramme explicatif les étapes de la méthode des puits

IV.10.3. La méthode des disques

Principe

Elle consiste à déposer des disques vierges imprégnés des souches lactiques en bouillon, à la surface des boîtes de Pétri préalablement inoculées par les souches cibles.

Technique

Dans cette méthode :

- un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide
- Des disques stériles de papier Whatman imbibés de surnageant de la culture à tester sont déposés sur ce tapis.
- Incubation de 24 heures à 37°C.

Lecture

La persistance des zones claires autour des disques bruts et neutralisés témoigne sur la présence d'un effet éventuel de bactériocines.



Figure 30 : préparation et réalisation de test des disques.

L'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes se révèle par l'apparition des zones claires d'inhibition autour des disques.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition (Z_i) qui apparaissent autour des disques, se fait selon la formule suivante :

$$Z_i \text{ en (mm)} = \text{Diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{Diamètre de disque (9mm)}$$

Les résultats



V. Isolement et identification des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre:

V.1. Isolement et identification

Il est important de signaler que l'isolement des bactéries lactiques était difficile à réaliser, puisque celles-ci sont très exigeantes en conditions de croissance. Lors de cette étude Un total de (6) souches des bactéries lactiques ont été isolés à partir du lait cru de chèvre sur un milieu sélectif, qui est le milieu MRS.

Les colonies obtenues sur milieu MRS sont identifiées par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests physiologiques, morphologiques et biochimiques, Les isolats Gram positif, catalases négatifs sont étudiées.

Après la détermination de leurs caractères les souches sont désignées par un code constitué de trois à quatre lettres et d'un chiffre, Les souches isolées nommées : S1, S2, S3, S4 et S5 et S6

Tableau 7 : Les codes des souches lactique isolées.

Milieux d'isolement	Code des souches isolées
Milieu MRS	S 1
	S 2
	S 3
	S 4
	S 5
	S 6

V.2. Purification et caractérisation des isolats

La caractérisation des isolats selon leur apparence macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

- Des colonies blanches avec une formes circulaires des contours réguliers, de très petites tailles environ (0.5 et 1mm).
- Autres colonies de couleur crème avec des formes circulaires de contours irréguliers, de tailles environ (1 à 3 mm).

Ces colonies sont obtenues à partir des boîtes pétri contenant le milieu MRS solide après 72h d'incubation à 37°C, et repiquées dans le bouillon MRS et incubé à 37°C pendant (48h à 72h) en anaérobiose.

V.3.Pré –identification des souches lactiques

V.3.1.Caractérisation macroscopique

- L'observation macroscopique des isolats lactiques sur le milieu solide montre l'existence des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres ou laiteuses, avec une surface lisse et un contour circulaire régulier (fig...)

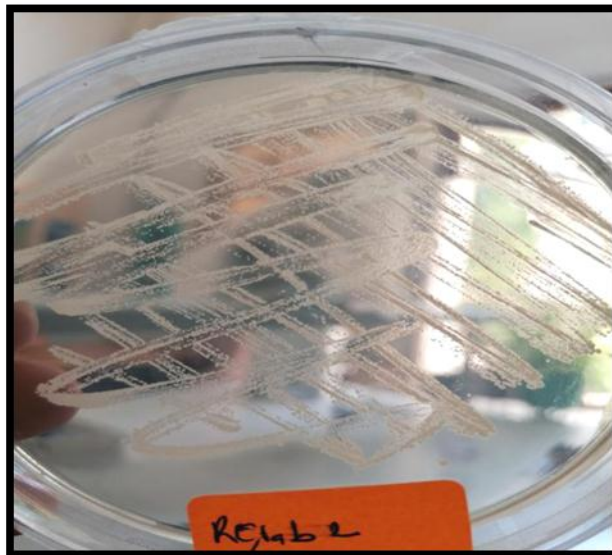


Figure 31 : aspect macroscopique des colonies des bactéries isolé obtenus 27h d'incubation à 37°C sur milieu MRS solide.

- L'observation macroscopique de la croissance des bactéries lactiques dans le milieu MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente de 5mm d'épaisseur à la surface du milieu liquide (fig.....)

Les souches présentes un trouble homogène sur MRS bouillon caractérise le groupe des bactéries lactiques.

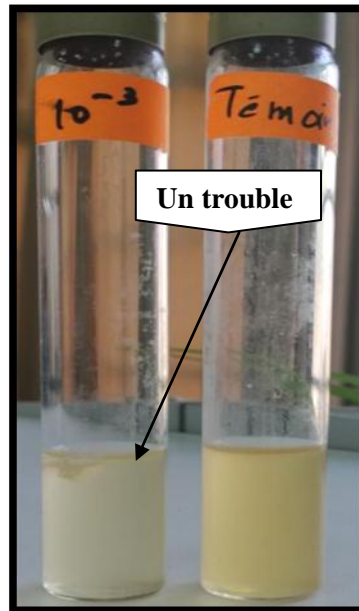
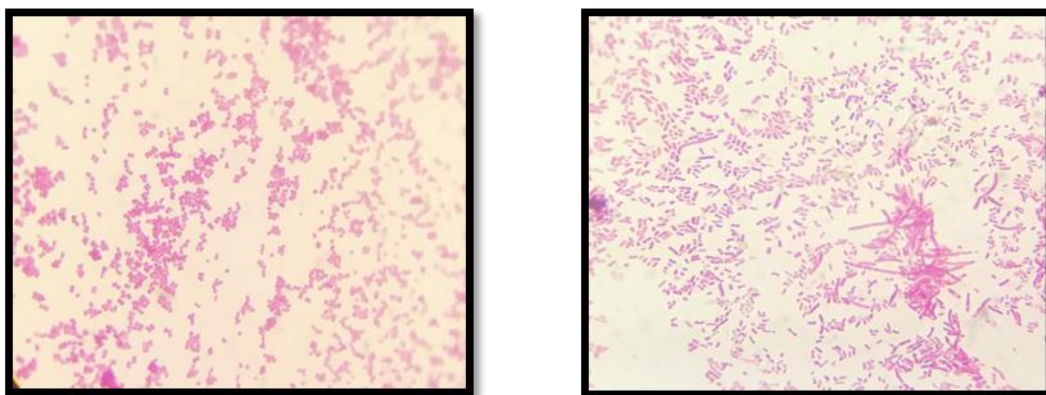


Figure 32 : Aspect macroscopique des bactéries isolées obtenus 2h d'incubation à 37°C sur bouillon MRS.

V.3.2. Caractérisation microscopique

Après la coloration de Gram, on a passé à l'observation microscopique au (Gx10), (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion afin de déterminer la forme cellulaire des bactéries isolées. La coloration de Gram révèle que ces souches sont tous Gram positif parmi les 6 souches isolées quatre isolats avaient une forme circulaire c'est des cocci. Le reste apparaît sous forme de bâtonnets, c'est des bacilles avec différents modes d'associations : isolés, en paires, en chaînettes de longueur variable et en amas.



(A) Coque Gram +

(B) Bacille Gram +

Figure 33: Aspect microscopique des bactéries lactique après coloration de Gram (Gx100).

Tableau 8 : présentation des critères morphologiques et biochimiques, des 6 isolats présumés des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre.

+ : positif ; - : négatif.

	Les critères morphologiques et biochimiques	Aspect macroscopique des colonies	Aspect microscopique		Etude biochimique
			La forme des cellules	La coloration de Gram	Test catalase
Le code des souches	S 1	Petites taille (2mm), rondes, laiteuse blanchâtre, à contour régulier	Cocci Courte Chaînette	+	-
	S 2	Petite (1mm), ronde, blanchâtre, laiteuse, à contour régulier	Cocci En amas	+	-
	S 3	Petites (1mm), ronde, bossue, blanchâtre, laiteuse, translucide	Cocci En amas	+	-
	S 4	Moyenne (2mm), blanchâtre, laiteuse, ronde, à bord régulier	Bacille	+	-
	S 5	Moyenne (2mm), blanchâtre, laiteuse, ronde, à bord régulier	Bacille	+	-
	S 6	Petite (1mm), ronde, blanchâtre, contour régulier	Cocci Dispersés et en amas	+	-

V.4. Les tests physiologiques

V.4.1. Recherche de catalase

Le test de catalase a été réalisé sur toutes les isolats lactiques obtenues après purification. Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont catalase négatives. Il s'agit bien que le groupe des bactéries qui sont caractérisées par l'absence de cet enzyme responsable de la production de cette réaction.

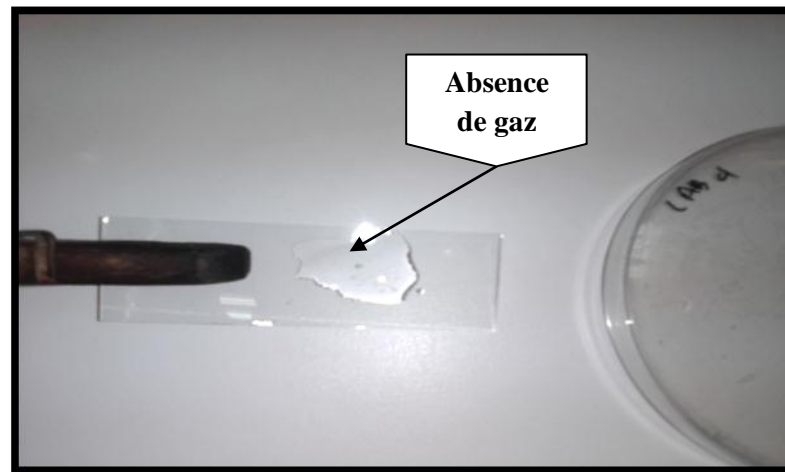


Figure 34 : résultats de test catalase des bactéries lactiques isolées

V.4.2. Recherche de type fermentaire

Les souches isolées et testées sont toutes homofermentaires, aucune production de gaz (CO₂) dans les cloches n'a été enregistrée.

La réalisation de ce test permet de distinguer entre les souches bactériennes homofermentaires et les autres souches qui sont hétéro-fermentaire en utilisant un milieu glucosé stérile qui contient des cloches de Durham dans les tubes.



Figure 35 : résultats de test type fermentaire des bactéries lactiques

V.4.3. Test de mannitol mobilité

Après incubation des tubes à essai, on observe que toutes les bactéries ont été développées tout au long de la pique sans envahissement du milieu, généralement elles sont immobiles.

La fermentation de mannitol par les isolats bactériens est exprimée par le virage de la coloration du rouge vers le jaune.

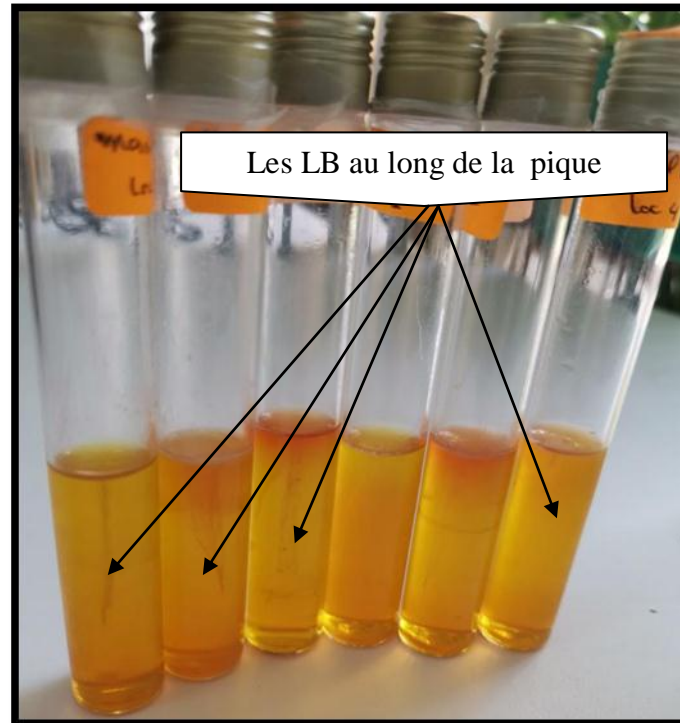


Figure 36 : les résultats de test de mannitol mobilité

V.4.4. Croissance à différentes température

Les variations de température d'incubation pour les différents isolats est un critère Physiologique de sélection pour l'identification des souches et permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile.

L'étude de la croissance des isolats bactériennes aux températures suivantes : 30°C, 37°C, 45°C et incubation pendant 24h, indique que toutes les souches isolées (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) sont capables de se croître sur le bouillon MRS aux températures déjà mentionnées.

V.4.5. Test de thermorésistance

La thermo résistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les souches pouvant tolérer une température de 62°C pendant 30. Le résultat positif se traduit par un trouble. Seules les souches thermophiles poussent, contrairement aux souches mésophiles qui sont incapables de se développer.

La majorité des souches isolées sont thermorésistantes, on observe une croissance sur le MRS bouillon après le traitement thermique.

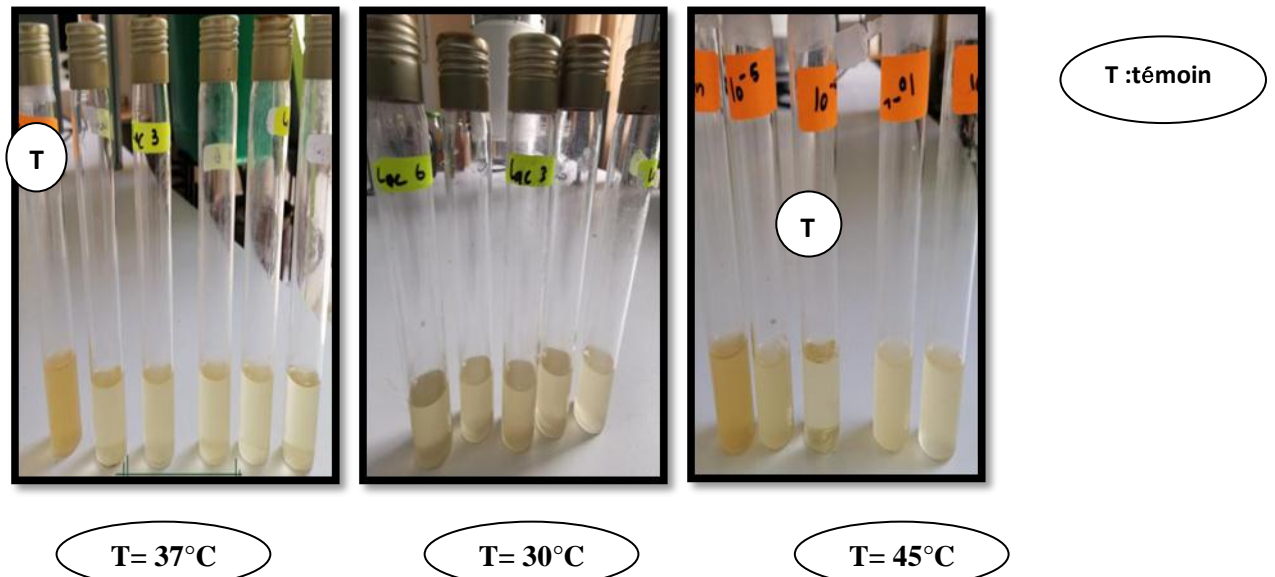


Figure 37 : résultats du test de croissance à différentes températures

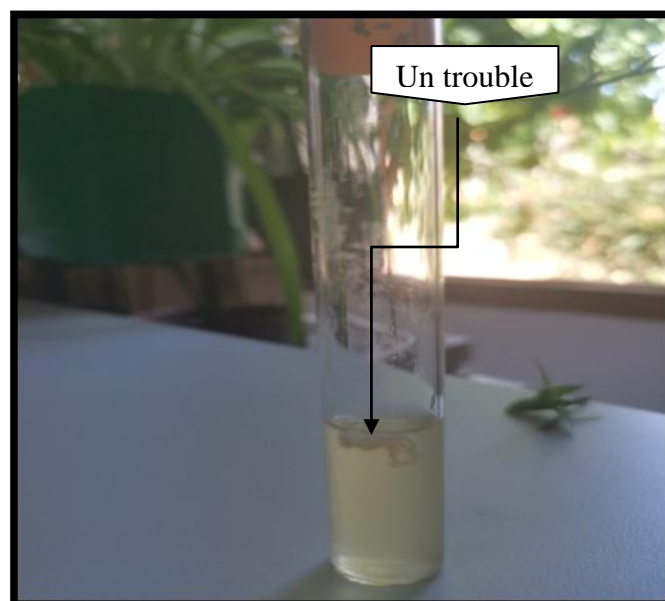


Figure 38 : les résultats de la thermorésistance.

V.4.6.Effet d'oxygène

Après incubation des souches sur le milieu MRS gélose en aérobiose, on a observé une croissance pour la plupart des souches testées en aérobiose.



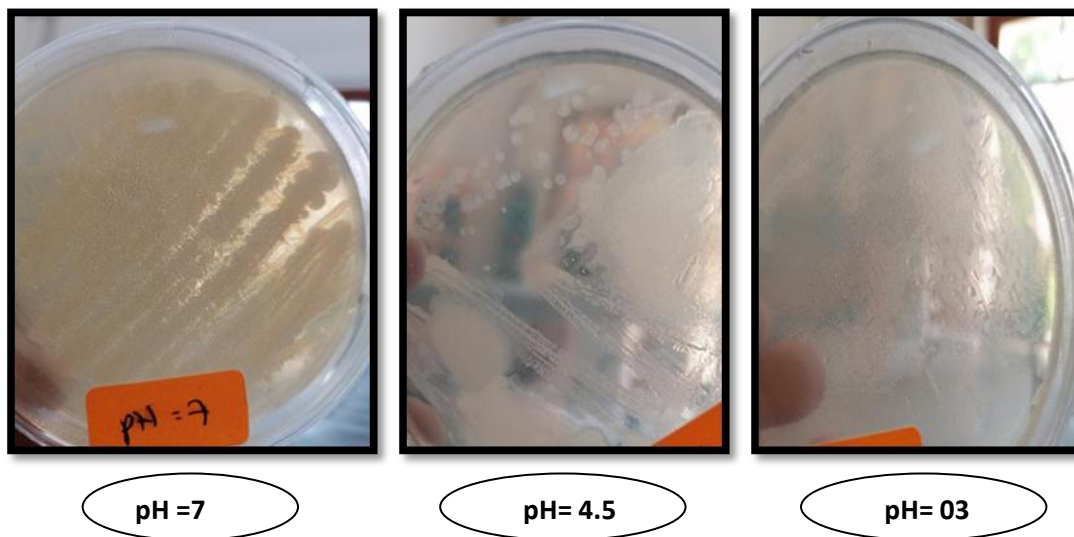
a) l'effet d'oxygène sur S4

b) l'effet d'oxygène sur S6

Figure 39 : les résultats de l'effet d'oxygène sur les bactéries lactiques isolées

V.4.7.Test de croissance à différentes valeurs de pH

La culture des souches lactiques dans différents pH, montre dans les résultats qu'il y a une croissance bactérienne des souches au pH=4.5, pH=7, pH=9. À pH=3 nous avons remarqué une absence de croissance.



pH = 7

pH = 4.5

pH = 03

Figure 40: les résultats de la croissance des bactéries lactiques à différents pH.

Tableau 9: les critères physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre

Les Critères	T= °C			pH				Effet d'O ₂	Type fermentaire	Mannitol mobilité	T=62° C	
	30	37	45	9	7	4.5	3					
Les souches	S1	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+
	S2	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+
	S3	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+
	S4	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+
	S5	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+
	S6	+	+	+	+	+	+	-	+	Homo	Immoble	+

+ Présence de croissance, - absence de croissance.

V.5. Test de l'antibiogramme :(résistance des bactéries aux antibiotiques).

La culture des bactéries lactiques permet d'étudier la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques .Les résultats d'antibiogramme indiquent que la plupart des souches lactiques sont sensibles aux antibiotiques.

Après incubation de 24h à 37°C, la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (zones d'inhibition de croissance bactériennes) trouvée autour des disques d'antibiotique permet de grouper les souches (résistante, sensible, intermédiaire) . Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 30 mm sont considérées comme sensibles.

Les résultats de l'antibiogramme sont mentionnés au **tableau** (10)

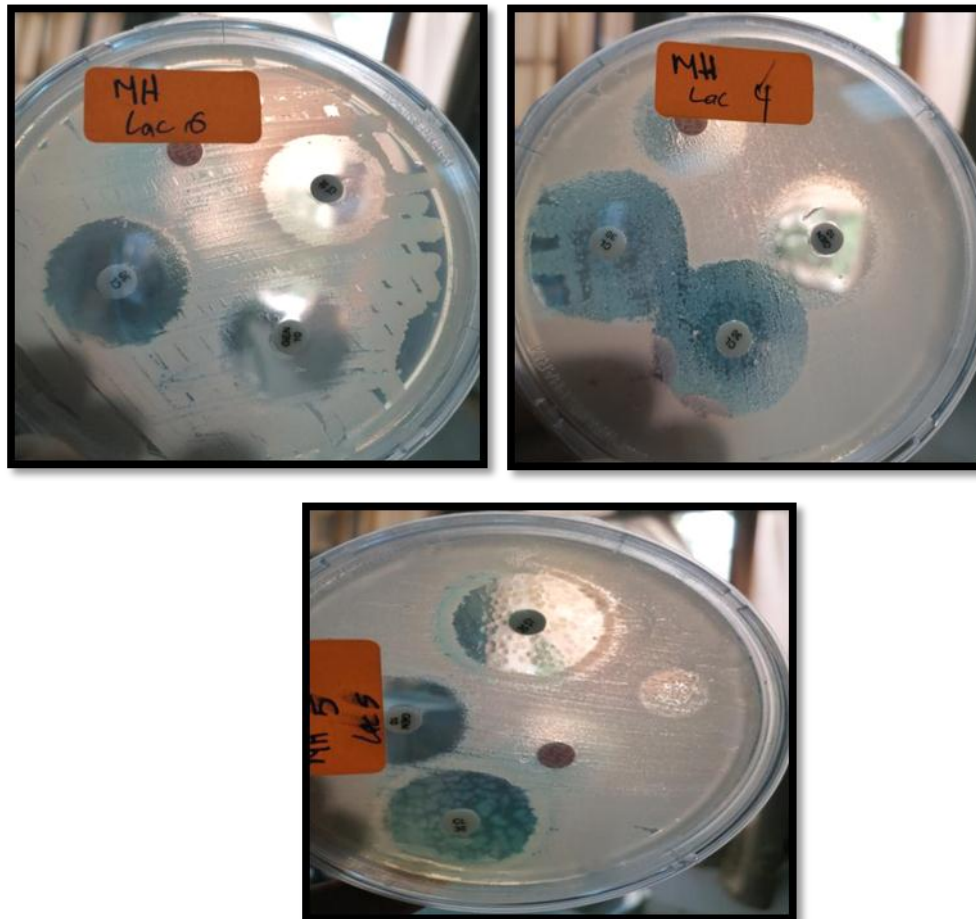


Figure 41 : les résultats d'antibiogramme des souches lactiques après incubation 24h à 37°C sur le milieu Muller Hinton solide



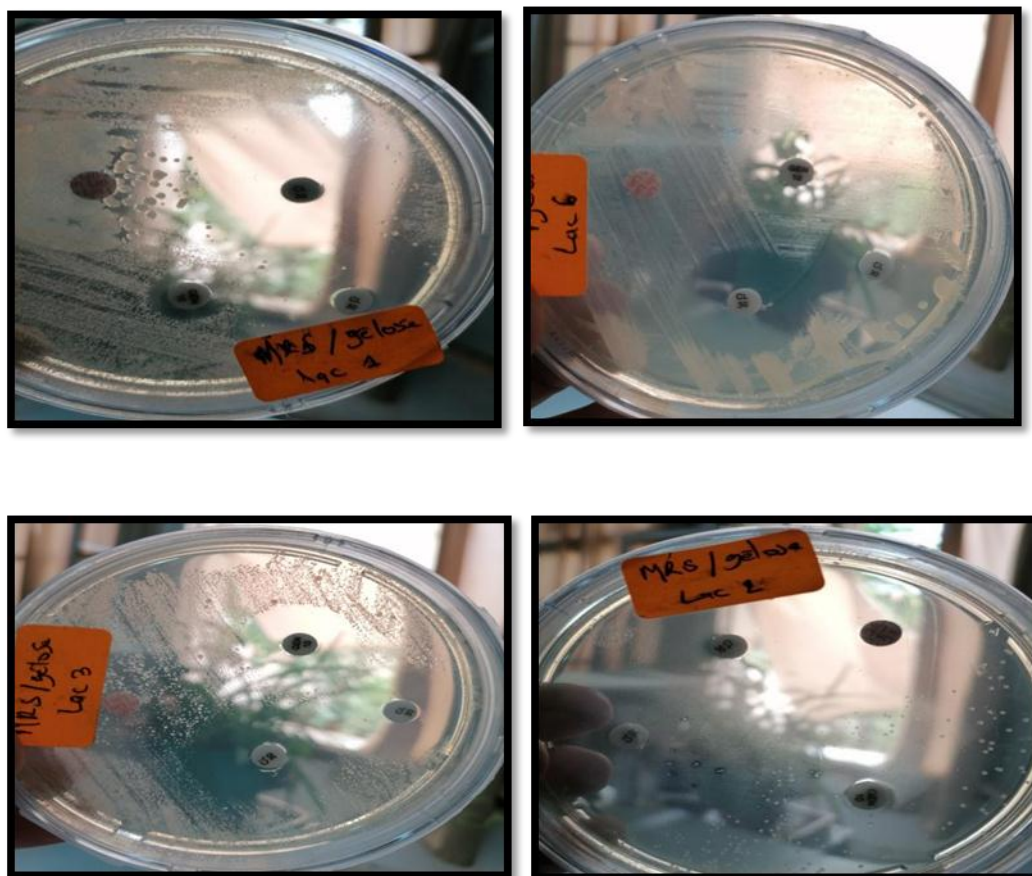


Figure 42 : les résultats d'antibiogramme des souches lactiques incubées pendant 24h à 37°C sur milieu MRS gélose.

Tableau 10 : les résultats de l'antibiogramme des souches lactiques isolées.

			Les souches testées								
Antibiotique	charge de disque	Symbole de disque	Milieu MRS Solide						Mueller-Hinton		
			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S4	S5	S6
Céphaléxine	30µg	CL	R 0	R 0	R 30	R 30	S 35	R 25	R 32	R 28	R 25
Gentamicine	10µg	GEN	R 14	R 0	R 24	R 21	R 20	R 20	S 30	R 25	R 25
Lincomycie	15µg	LIN	R 0	R 0	R 0	R 0	R 0	R 0	R 25	R 0	R 0

S : des bactéries sensibles, R : des bactéries résistantes en mm

V.6. Test de l'antagonisme (recherche des bactériocines)

V.6.1. Méthode de diffusion en puits

Elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencé en touche, la lecture de résultats consiste à mesurer le diamètre de l'halo d'inhibition.

V.6.1.1 Activité antagoniste des souches vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922 :

Sur le milieu MRS solide : les résultats obtenus ont révélé la présence de zone d'inhibition chez deux souches sur: **S2, S4** et l'absence des zones chez le reste des souches (**S1, S3, S5, S6**) donc ces souche ne présentes aucune activité antibactérienne contre E- coli.

Sur le milieu Muller-Hinton : aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits, donc on n'a pas d'activité bactérienne.

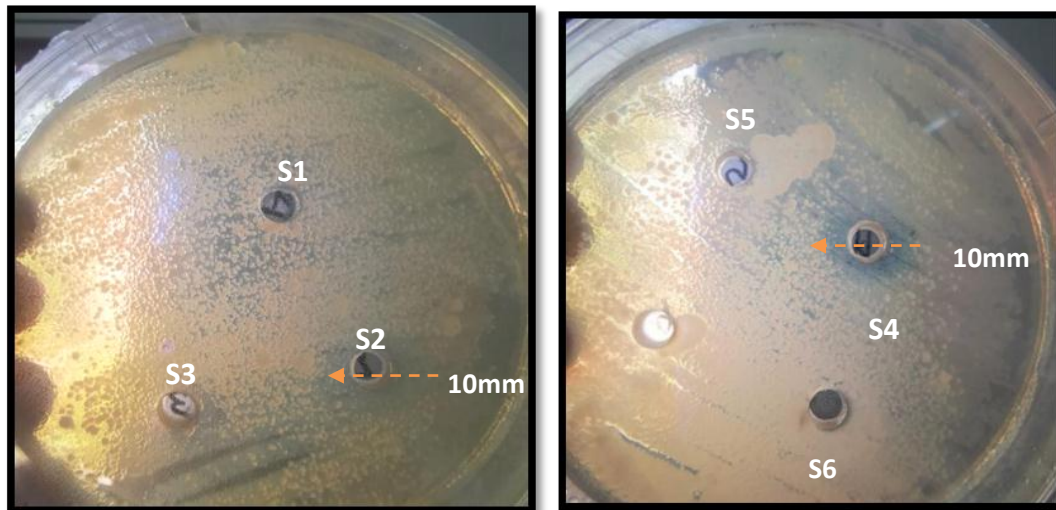


Figure 43: les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche *d'E-coli* par la méthode de diffusion en puits.

V.6.1.2. Activité antagoniste des souches vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 :

Sur les deux milieux (MRS et Muller-Hinton) : les résultats obtenus ont révélé l'absence total des zone d'inhibition chez toutes les souches donc ces souche ne présentes aucune activité antibactérienne contre la souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

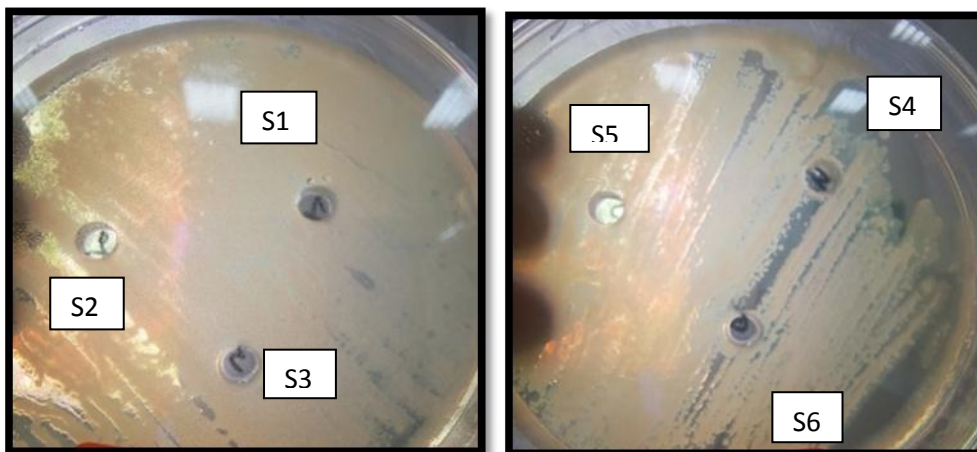


Figure 44: les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche de *Staphylococcus aureus* par la méthode de diffusion en puits.

V.6.1.2. Activité antagoniste des souches vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

Sur le milieu MRS solide : les résultats obtenus ont révélé la présence de zone d'inhibition chez deux souches sur: **S4, S5** et l'absence des zones avec le reste des souches (**S1, S3, S2, S6**) donc ces souches ne présentent aucune activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* .

Sur le milieu Muller-Hinton : aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits, donc pas d'activité bactérienne.

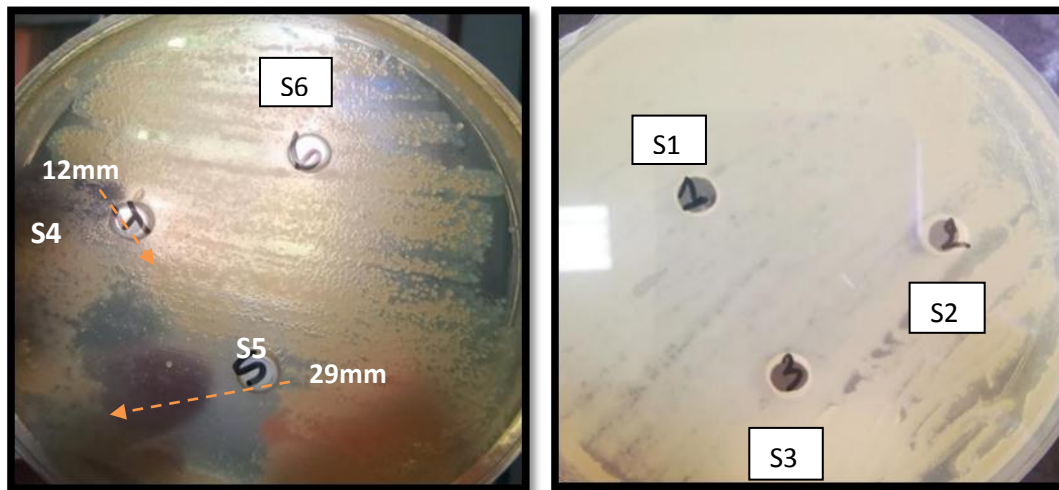


Figure 45 : Les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques sur le milieu MRS solide vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode de diffusion en puits.

V.6.2. Méthode de disques

Les résultats obtenus des souches lactiques testés par la méthode des disques vis-à-vis de trois souches pathogènes, ont révélé la présence des zones d'inhibition. Donc la production des bactériocines, la plupart des isolats possèdent un effet inhibiteur indiqué par la formation des halos autour la souche.

V.6.2.1. Activité antagoniste des souches vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922 :

Les résultats obtenus sur le milieu MRS solide ont révélé la présence de zone d'inhibition chez la souche 4 (S4) et la souche 5 (S5) et l'absence des zones chez les autres souches (**S1, S2, S3, S6**) donc ces souches ne présentent aucune activité antibactérienne contre E- coli.

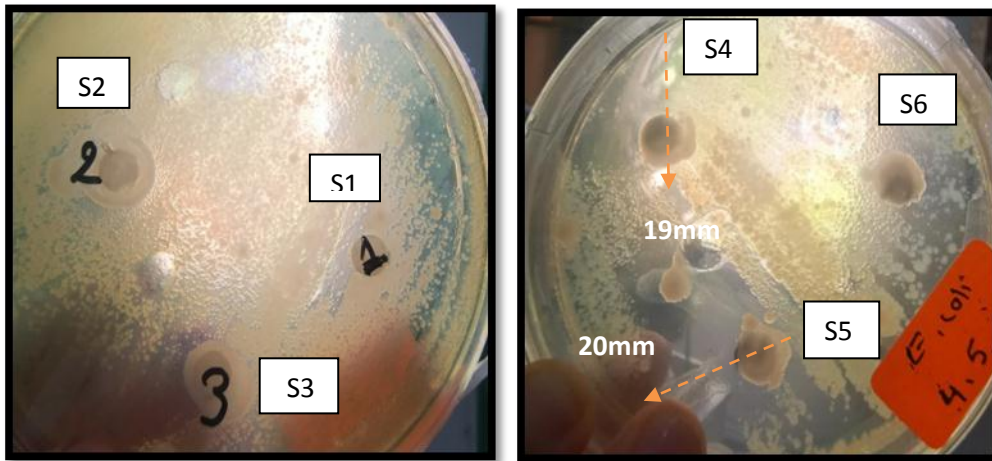


Figure 46: les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche d'*E. coli* par la méthode de disque.

V.6.2.2. Activité antagoniste des souches vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

Les résultats obtenus ont révélé la présence des zones d'inhibition autour des disques. Les 5 souches lactiques (S2, S3, S4, S5, S6) ont manifesté une activité antibactérienne à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Par contre nous avons remarqué l'absence des zones chez la souche 1 (S1), donc cette souche ne présente aucune activité antibactérienne contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

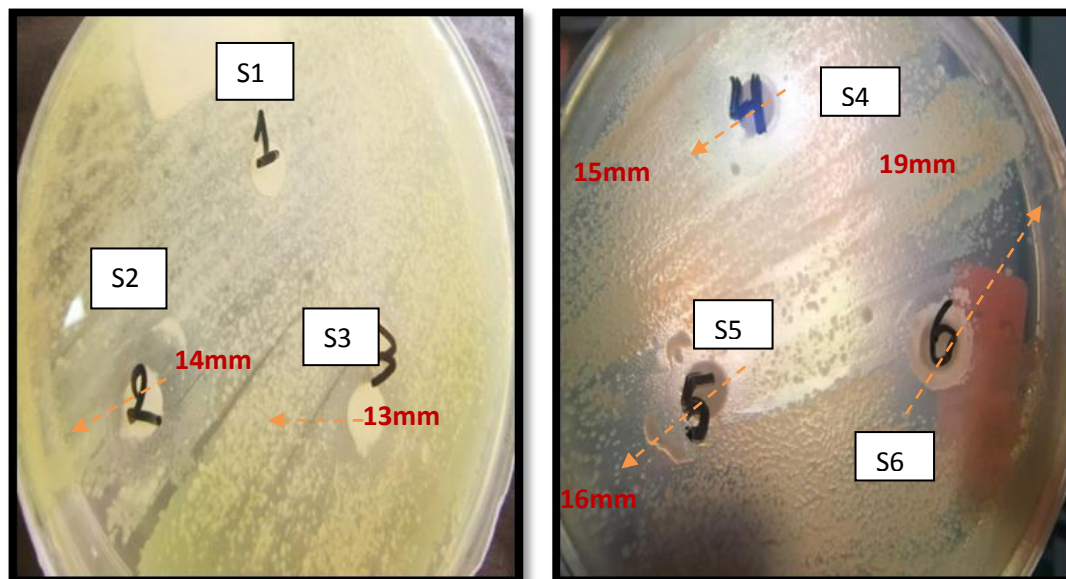


Figure 47: Les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode de disque.

V.6.2.3. Activité antagoniste des souches vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 :

Les résultats obtenus ont révélé la présence des zones d'inhibition autour des disques. Les souches lactiques (S3, S4) possèdent une activité antibactérienne à l'encontre de *Staphylococcus aureus*. Nous avons observé l'absence des zones chez les souches (S1, S2, S5, S6) donc ces souches ne présente aucune activité antibactérienne contre la souche de *Staphylococcus aureus*.

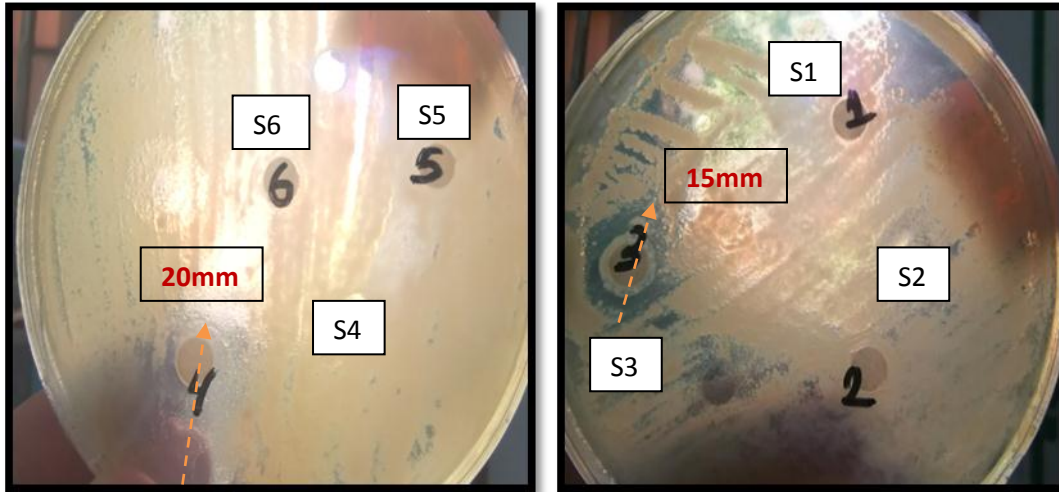


Figure 48: les résultats d'effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche de *Staphylococcus aureus*, par la méthode de disque.

Tableau 11: le spectre d'activité antibactérienne des souches lactiques par la méthode de diffusion en puits et la méthode de disque vis-à-vis des souches pathogènes.

Les souches	l'activité antagoniste par la méthode de diffusion en puits		
	Diamètre des zones d'inhibition en mm		
Indicatrices	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.
Inhibitrices			
S 1	00 mm	00 mm	00 mm
S 2	00 mm	10 mm	00 mm
S 3	00 mm	00 mm	00 mm
S 4	12 mm	10 mm	00 mm
S 5	29 mm	00 mm	00 mm
S 6	00 mm	00 mm	00 mm
L'activité antagoniste par la méthode de disque			
S 1	00 mm	00 mm	00 mm
S 2	14 mm	00 mm	00 mm
S 3	13 mm	00 mm	00 mm
S 4	15mm	19 mm	15 mm
S 5	16 mm	20 mm	20 mm
S 6	19 mm	00mm	00mm

Discussion



V. Discussion

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bioconservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes (Uehara *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish *et al.*, 2011).

Dans notre étude 6 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru de chèvre. Elles ont été cultivées et isolées sur le milieu MRS qui est un milieu riche offre aux bactéries lactique différents sources des nutriments qui facilitent la croissance des bactéries telles que le glucose et l'azote, les peptones et le tween80. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de cultures doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (Pilet M-F, *et al.*, 2005)

L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de genres et d'espèces isolées à partir du lait cru de chèvre et de vache. Les espèces de bactéries lactiques détectées essentiellement de la nature de lait cru et des conditions d'analyses (Saidi *et al.*, 2002)

La présence de divers genres de bactéries lactique dans le lait de chèvre était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés.

Les résultats de la culture des bactéries lactiques dans cette étude montrent que la plupart des souches sont des coques avec 90% par rapport aux bacilles qui montrent une faible présence 10 %. le même type de résultats est apporté par Franciosi *et al.*, (2009) ; (Cheriguene A,2008) ; (Bekouche Fet Boulahrouf A,2005) et Kacem M. *et al.*, 2002).

Les analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques ont mis en évidence toute la diversité de la flore lactique isolée à partir du lait de chèvre, la composition de bactéries lactiques est relative et dépend des différents critères utilisés dans chaque étude. L'identification phénotypique des souches conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

L'identification des isolats lactiques incubées sur le milieu MRS solide selon leurs aspects macroscopiques est permet de distingués des colonies de petites à moyenne taille avec une couleur blanchâtre, laiteuses à contour régulier, lisse et une forme ronde et selon leurs aspects microscopiques sont des couques et d'autres souches en forme bâtonnet à Gram positif, et catalase négative non sporulée (**Teuber M. et Geis A.,2006 ; Guiraud,2003**).

Les résultats d'identification phénotypique de la souche cinq (S5) indiquent que cette souche de forme bâtonnet, à Gram positif et de catalase négative elle s'agit de *Lactobacillus* qui est capable de fermenter le glucose sans dégagement de gaz elle est homofermentaire (**Hammes et Hertel, 2006**).

Les résultats de test de la croissance des bactéries lactiques à des différentes températures indiquent qu'il ya des souche qui peuvent croitre à 45C° et d'autres qui sont thermorésistantes, et selon le test de type fermentaire toutes les souches sont homofermentaire, et immobiles. Des résultats similaires ont été rapportés par (**Bensalah,2006**).

Les résultats de la croissance des souches lactiques à des différents pH obtenues à indiquer la présence de croissance à pH= 9, pH= 7 , et l'absence de croissance à pH =3. Ces résultats trouvés sont similaires à les résultats rapportés par (**Abdlmalek,2016**).

Le test d'antibiogramme indique que la majorités des souches sont résistantes aux antibiotiques utilisées (Céphaléxine 30µg , Gentamicine ,10µg , Lincomycie ,15µg) , avec des diamètre inferieur à 35mm , et la souche 5 et sensible à Céphalexine avec un diamètre égale à 35mm.

Les résultats de test d'activité antagoniste obtenus par les deux méthodes (méthode des diffusions en puits, et la méthode de disque) ont démontré la présence de zones d'inhibition autour des puits et autour des disques traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre les trois souches pathogènes utilisées. Le tableau (11) représente les moyennes des diamètres d'inhibition exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche.

Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques, d'origine laitière ou autre, contre des bactéries pathogènes et altérantes a été mentionnée par plusieurs auteurs (**De**

Martinis et al., 2001 ; Anas et al., 2008 ; Yateem et al., 2008 ; Moraes et al., 2010 ; Abrams et al., 2011 ; Castro et al., 2011).

Les 6 souches ne présentent aucune activité inhibitrice contre la souche pathogène par la méthode de diffusion en puits.

Par la méthode de disque les souches lactiques 4 et 5 présentent des zones d'inhibition 19 mm et 20 mm vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25922 et les souches 3 et 4 vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un diamètre 15 mm et 20 mm respectivement. **González et al., 2007** ont isolé et identifié 125 souches de *Lactococcus* dont 13 souches étaient capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Parmi les 6 souches lactiques isolées, 4 souches (S2, S3, S5, S6) présentent une forte activité inhibitrice contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 par la méthode de disque donc elles possèdent des bactériocines.

Une remarque importante sur l'effet inhibiteur des souches isolées qui varié selon la méthode de test utilisé .L'effet inhibiteur de la souche S5 vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25922 obtenu par la méthode de disque a disparu avec la méthode de diffusion en puits , la même chose pour les souches et (S3) et (S4) vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et l'effet inhibiteur des souches S2 , S3 vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 obtenu par la méthode de disque a disparu avec la méthode de diffusion en puits.

La méthode de disque est efficace pour indiquer la formation des zones d'inhibition et la production des bactériocines parce que l'agent pathogène sera en contacte directe avec la souche testé, une forte concentration pour établir la réaction d'inhibition.

Les bactéries lactiques synthétisent des agents bactéricides qui varient dans leur spectre d'activité. Beaucoup de ces agents sont des bactériocines de structure protéiques (**Zacharof et Lovitt, 2012**).

Les bactéries présentent des mécanismes de compétition pour les nutriments et l'espace dans leur habitat. Parmi ces mécanismes : l'acquisition de défense par la production de peptides antimicrobiens (AMP) qui font références aux bactériocines.

Les bactéries lactiques peuvent produire un à plusieurs types de bactériocines (**STOYANOVA et al., 2007**); ayant un large ou étroit spectre d'activité contre des bactéries Gram-positives et Gram négatives (**OSAMA, 2019 ;WALA'A, 2018**).

Le pouvoir antibactérien confirmé des souches isolées à partir du lait cru de chèvre pourrait favoriser leur utilisation en tant que bio conservateurs ou starters dans les produits fermentés après évaluation de leur pouvoir fermentaire ou en tant que probiotiques après la réalisation de plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* (tolérance aux conditions hostiles du tube digestif, tolérance aux sels biliaires, adhérence au mucus intestinal, ...etc.). De plus, ces souches peuvent être exploitées dans la transformation biotechnologique des produits laitiers, et dans l'industrie agro-alimentaires .Le pouvoir antagoniste peut servir pour une meilleure bio-préservation des aliments à grand échelle.

CONCLUSION

Les bactéries lactiques ont un intérêt primordial en alimentation il ya au moins quatre milles ans que l'homme sert de ces bactéries pour la fermentation des aliments, et étant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes mais aussi d'être utilisées en tant que bio-conservateurs. Ces bactéries jouent un rôle important dans la prévention et le traitement des maladies bactériennes et virales par différents mécanismes.

L'exploration des antimicrobiens d'origine naturelle fait l'objet d'une attention croissante en raison de la fréquence alarmante de la résistance bactérienne qui menace la vie humaine. Largement utilisés comme des cultures starter dans les produits laitiers, les viandes et les fermentations végétales. Les bactéries lactiques présentes dans les écosystèmes humains ou animaux. En effet, plusieurs études portant sur les bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées à partir du lait et des produits laitiers, ont mis en évidence le potentiel remarquable de ces agents antimicrobiens.

Dans cet aperçu, notre présente étude a été conçue dans le but de rechercher des bactéries lactiques productrices de bactériocines.

Au cours de ce travail, les bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru de chèvre originaire de la région de Sidi bel Abbes ; suivi d'une étude de l'antagonisme par deux méthodes (méthode de diffusion en puits, méthode de disque) vis-à-vis à trois souches pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 25922. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 .*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Les résultats d'étude de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion en puits ont révélé un potentiel antimicrobien des souches lactiques (S4), (S5) à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 .Les zones d'inhibitions obtenues, ont montré une tendance prometteuse en ce qui concerne l'activité inhibitrice envers *P. aeruginosa*, avec 12mm et 25 mm respectivement. Contrairement aux résultats obtenus par la méthode de disque, 4 souches (S2), (S3), (S5), (S6) présentent une activité antagoniste avec 14 mm, 13mm ,12 mm ,19 mm respectivement.

L'absence d'activité inhibitrice vis-à-vis à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode des puits, et présence en méthode des disques chez les souches (S3) avec un diamètre 15mm, et 20 mm pour (S4).









La présence d'activité inhibitrice par la méthode de disque vis-à-vis à *Escherichia coli* ATCC 25922 chez les souches (S4), (S5) avec le diamètre de 19mm et 20 mm respectivement. Et chez les souches (S2), (S4) le diamètre est égale à 10 mm.


Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives, nous
Proposons :

- ✚ L'identification génomique des bactéries lactiques productrices de bactériocines, l'étude a un intérêt en industrie agro-alimentaire, en bioconservation des aliments et la fermentation.
- ✚ L'optimisation de la production des bactériocines par les bactéries lactiques.
- ✚ Détermination de la structure des bactériocines et l'étude de leurs intérêts en industrie agro-alimentaire et en biotechnologie.

Références bibliographiques

 **A**

-  **AGGAD, Hebib, MAHOUZ F., et Kihal Mebrouk. 2009.** «° Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien ». Revue de médecine vétérinaire 160 (janvier): 590-95.
-  **Albert Larbalétrier « Traité pratique de laiterie: lait, crème, beurre, fromages - -GoogleLivres ».** s. d. Consulté le 28 mai 2021.
<https://boks.google.dz/books>
-  **Almeida Júnior, Washington Luiz Gonçalves de, Íris da Silva Ferrari, Jane Vianade Souza, Carla Daiane Andrade da Silva, Mateus Matiuzzi da Costa, et Francesca Silva Dias. 2015.**«° Characterization and Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk ». Food Control 53 (juillet): 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.013>.
-  **Amiot, J., Lapointe., VIGNOLA, C.(2002)** Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses Intel polytechnique, Québec. 600.
-  **Axelsson L., 2004.** Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66..
-  **Axelsson L. T. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.
-  **Amigo, L., et J. Fontecha. 2020.** «° Goat Milk ». In Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00126-4>.
-  **Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., 2000.** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. App. Env. Microbiol. **66**(5) : 2001-2005.

-  **Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. Food Control. **17** : 454-461.

 **B**

- ✚ **Badis, A., N. Laouabdia-Sellami, D. Guetarni, M. Kihal, et R. Ouzrout. 2005.** «° caractérisation phénotypiques ds bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre dedeux populations caprines locales "Arabia et kabyle " *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, juin, 30-37.
- ✚ **BEKHOUCHE, F, et A. BOULAHROUF. 2005.** «° Etude qualitative des bactéries lactiques des lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevages de Constantine *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* 0 (23): 38-45.
- ✚ **Bermúdez-Humarán, Luis G., et Philippe Langella. 2009.** «° Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux . *Revue Francophone des Laboratoires*, Évolutions récentes en microbiologie, 2009 (417): 79- 89.
[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(09\)70312-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(09)70312-0).
- ✚ **Bhartimittu, Dr. 2015.** «° Role of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk in Cancer Prevention . *Autoimmune and Infectious Diseases: Open Access* (ISS2470-1025) 1 (janvier). <https://doi.org/10.16966/2470-1025.108>.
- ✚ **Boyaval, Patrick, Parwin Bhugaloo-Vial, Frédérique Duffes, Anita Metivier, Xavier Dousset, et Didier Marion. 1998.** «° Réacteurs à hautes densités cellulaires pour la production de solutions concentrées de bactériocines . *Le Lait* 78 (1): 129-33. <https://doi.org/10.1051/lait:1998116>.
- ✚ **Bylund, G. (1995).** Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems. Lund, Sweden, P 436.
- ✚ **Billon, P., Sauve, O. (2009).** Traite des vaches laitières. 3ème édition, France, 555 p.
- ✚ **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.
- ✚ **Brugère H.,** cours sur le lait et les produits laitiers, Ecole National Vétérinaire de Toulouse , 2003.
- ✚ **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.

- ✚ **Carr, Frank J., Don Chill, et Nino Maida. 2002.** «° The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey . *Critical Reviews in Microbiology* 28 (4): 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>.
- ✚ **Chye, Fook Yee, et Mohd Ayob. 2004.** «° Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia . *Food Microbiology* 21 (octobre): 535-41. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.007>.
- ✚ **Cotter, Paul D., R. Paul Ross, et Colin Hill. 2013.** «° Bacteriocins - a Viable Alternative to Antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology* 11 (2): 95- 105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- ✚ **Chanokphat, P. (2005).** Caseine micelle structure : a concis review. *Jornal of science and technology* , 1(27), 201-212.
- ✚ **Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- ✚ **D**
- ✚ **Dagnaw, Gashaw, Mebrat A, Wubie A, et Kendie H. 2016.** «° Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value . *Journal of Nutrition and Health Sciences* 3 (novembre). <https://doi.org/10.15744/2393-9060.3.401>.
- ✚ **Dilmi Bouras A.(1991).** Assimilation du cholestérol par les bactéries lactique 1991. These de doctorat . Institut national agronomique . EL HARRACHE-ALEGER . SCIENCE ALIMENTAIRES. 143p
- ✚ **Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P.,Gruss, A. (2001).** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol.*183: 4509-4516.
- ✚ **Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N.P., 2007.** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. **86** : 21-38.
- ✚ **De Vuyst, Luc, et Frédéric Leroy. 2007.** «° Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications . *Journal of*

Molecular Microbiology and Biotechnology 13 (4): 194-99.
<https://doi.org/10.1159/000104752>.

✚ **Dortu, C., et Philippe Thonart. 2009.** «° Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires . *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13 (1).
<https://orbi.uliege.be/handle/2268/17346>.

Dortu, Carine, et Philippe Thonart. 2009a. «° Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits

alimentaires . *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12.———. 2009b. «° Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires . *BASE*, janvier.
<https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=3626>.

✚ **Drider Djamel. 2009.** Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles / sous la direction de Djamel Drider, Hervé Prévost ; [préface d'Alexandra Gruss]. Paris: Economica.

✚ **Duhan, Joginder, Kiran Nehra, S. Gahlawat, Pooja Saharan, et Surekha. 2013.** «° Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria . In *Biotechnology: Prospects and Applications*, 127-42. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1683-4_11.

✚ **Dagnaw, Gashaw, Mebrat A, Wubie A, et Kendie H. 2016.**« Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value ». *Journal of Nutrition and Health Science*3(novembre).<https://doi.org/10.15744/2393-9060.3.401>.

✚ F

✚ **F.A.O. 2015.** Données statistiques sur l'élevage.
<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/F>

✚ **Favier, J. C., Ripert, A., Toque, D., et Feinbery, M. (1995).** Répertoire général des aliments. Table de composition, p 100.

✚ G

✚ **García, V., S. Rovira, K. Boutuial, et M. B. López. 2014.** «° Improvements in Goat Milk Quality: A Review . *Small Ruminant Research*, Special Issue: Industrial and Rural Activities in the Goat Sector including Science,

Innovation and Development, 121 (1): 51-57.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>.

- ✚ **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie Alimentaire. Ed Dunod, Paris, 652p.
- ✚ **Gelais, S. T., Ouldbaba, A., et Turct, S. (1999).** Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. Edit : ISBN.Canada. 101-111.
- ✚ **Gelais, S.T. (2002).** Composition du lait de chèvre et son aptitude à la transformation- Canada, Québec.
- ✚ **Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., 2005.** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS. Microbiol. Rev. **29** : 591-610.
- ✚ **Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237- 251.







✚ **H**

- ✚ **Hatti-Kaul, Rajni, Lu Chen, Tarek Dishisha, et Hesham El Enshasy. 2018.** «° Lactic Acid Bacteria: From Starter Cultures to Producers of Chemicals . *FEMS Microbiology Letters* 365 (20). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>.
- ✚ **Hayek, Saeed A., et Salam A. Ibrahim. 2013.** «° Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review . *Food and Nutrition Sciences* 4 (11): 73- 87. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>.
- ✚ **Huang, Zhihai, Lu Huang, Guangliang Xing, Xiao Xu, Chuanhai Tu, et Mingsheng Dong. 2020.** «° Effect of Co-Fermentation with Lactic Acid Bacteria and *K. Marxianus* on Physicochemical and Sensory Properties of Goat Milk . *Foods(Basel, Switzerland)* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/foods9030299>
- ✚ **Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.






✚ **J**

- ✚ **Johnson, Eldin Maliyakkal, Dr Yong-Gyun Jung, Dr Ying-Yu Jin, Dr Rasu Jayabalan, Dr Seung Hwan Yang, et Joo Won Suh. 2018.** «°Bacteriocins as Food Preservatives: Challenges and Emerging Horizons . Critical Reviews in Food Science and Nutrition 58 (16): 2743- 67. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>.
- ✚ **Jouyandah, H., et Abroumand, A. (2010).**Physico-chemical, nutritional, heat treatment effects and Dairy product aspects of goat and sheeps milks. World Applied Science Journal. 11 (11), 1316-1322.
- ✚ **K**
- ✚ **Kalyankar, S. D., C. D. Khedkar, et A. M. Patil. 2016.** «°Goat: Milk . In Encyclopedia of Food and Health, édité par Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, et Fidel Toldrá, 256-60. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00358-5>.
- Kassaa, Imad. 2019.** «°LABiocin database: a new database designed specifically for Lactic Acid Bacteria bacteriocins. , août.<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.012>.
- ✚ **Kerboua M., Feliachi K., Abdelfettah M., Ouakli K., Selhab F., Boudjakdji A., Takoucht A., Benani Z., Zemour A., Belhadj N., Rahmani M., Khecha A., Haba A., Ghenim H. 2003.** Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales : Algérie. Commission national AnGR, Point focal algérien pour les ressources génétiques, p 29-30.
- ✚ **Khelifi Y. 1999.** «°Les productions ovines et caprines dans les zones steppiques algériennes . In Systems of sheep and goat production: Organization of husbandry and role of extension services, édité par Morand-Fehr P. et Rubino R., 38:245-47. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a38/99600166.pdf>.
- ✚ **Khalid N.M. et Marth E.H., 1990.** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci. 73 : 158-167.



 L

-  **Lapointe-Vignola, Carole, et Fondation de technologie laitière du Québec. 2002.** *Science et technologie du lait: transformation du lait.* Presses inter Polytechnique.
-  **Luquet, François M., et Georges Corrieu. 2005.** *Bactéries lactiques et probiotiques.* Lavoisier Tec & Doc.
-  **Larpent, J. P. (1991).** Influence de l'alimentation et de la saison sur la composition du lait . In la vache laitière. 231-246, ed INRA publication, route de St-cyr, 78000,versailles.
-  **Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* **15** : 67-78.
-  **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **144** : 237-250.
-  **Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994.** Les grands groupes de bactéries. In : *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien.* DOIN. Paris. 445.





 M

-  **Mehta, Bhavbhuti. 2015.** «°Chemical Composition of Milk and Milk Products . In , 511-53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_31.
-  **Mahé, M .F., Manfredi, E., Ricordeau, G., Piacere, A., Grosclaude, F. (1993).** Effe du polymorphisme de la caséine #S 1 caprine sur les performances laitières : analyse intradscendance de bouc de race Alpine . *Genetic science and evolution* , 26, pp 151-157.
-  **Masie, I., Morgane, F. (2001).** Aptitude de lait de chèvre à l'acidification par les ferment lactiques- Facteurs de variation liés à la composition du lait, 81,pp. 561-569 .
-  **Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M., 2004.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
-  **Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592


 **N**

-  **N-E, Karam. s. d.** «° Bactériocines de bactéries lactiques : caractérisation d'une bactériocine d'Enterococcus BO2 Bacteriocins of lactic acid bacteria: characterisation of a bacteriocin from Enterococcus BO2 , 1.
-  **Negash, Abebe, et Berhanu Tsehai. 2020.** «° Current Applications of Bacteriocin . International Journal of Microbiology 2020 (novembre): 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>.


 **P**

-  **Papadimitriou, Konstantinos, Ángel Alegría, Peter A. Bron, Maria de Angelis, Marco Gobbetti, Michiel Kleerebezem, José A. Lemos, et al. 2016.**«° Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria . Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR 80 (3): 837-90. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>.
-  **Picon, A., O. López-Pérez, E. Torres, S. Garde, et M. Nuñez. 2019.** «° Contribution of Autochthonous Lactic Acid Bacteria to the Typical Flavour of Raw Goat Milk Cheeses . International Journal of Food Microbiology 299 (juin): 8-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.011>.
-  **Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 1998.** Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.
-  **Papadimitriou, Konstantinos, Ángel Alegría, Peter A. Bron, Maria de Angelis, Marco Gobbetti, Michiel Kleerebezem, José A. Lemos, et al. 2016.** «° Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria
-  **Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

 **Q**

-  **Quiberoni A., Rezaiki L., El Karoui M., Biswas I., Tailliez P., Gruss A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. Res Microbiol.152: 131-139.

 **R**

-  **Reuter, G. 1985.** «° Elective and Selective Media for Lactic Acid Bacteria . International Journal of Food Microbiology 2 (1): 55-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90057-1).

✚ **Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* **34** (2) : 218-227.

✚ **Rodríguez, Cecilia, Marta Medici, Fernanda Mozzi, et Graciela Font de Valdez. 2010.** «° Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis . *World Journal of Gastroenterology* : WJG 16 (13): 1622-30. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i13.1622>.

✚ S

✚ **Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Letters.* **46** : 201-203.

✚ T

✚ **Taale, Essodolom, Aly Savadogo, Cheikna Zongo, François Tapsoba, Simplicie D.Karou, et Alfred S. Traore. 2016.** «° Les Peptides Antimicrobiens d'origine Microbienne: Cas Des Bactériocines . *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 10 (1): 384- 99. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i1.29>. **Tamime A.Y., 2002.** Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

✚ V

✚ **Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings, J. (1996)** .Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.***60**: 407-438.


✚ W

✚ **Wassie, Misganaw, et Teketay Wassie. 2016.** «° Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk ,P 6.

✚ Z

✚ **Zacharof, M. P., et R. W. Lovitt. 2012.** «° Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article . *APCBEE Procedia*, 3rd International

Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012), April 7-8, 2012, 2 (janvier): 50- 56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>.

 **Zielińska, Dorota, et Danuta Kolożyn-Krajewska. 2018.** «°Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review . *BioMed Research International* 2018: 5063185. <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>.

les Annexes

Annexe 1 : Les composants des Milieux de culture**1. Milieu MRS gélose (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de Levure	05g
Extrait de Viande	10g
Peptone	10g
Acétate de Sodium	05g
Citrate d'ammonium	02g
Glucose	20g
Phosphate di-potassique (K ₂ Hpo ₄)	02g
Sulfate de magnésium (MgSo ₄)	0.25g
Sulfate de manganèse (MnSo ₄)	0.05g
Tween80	1ml
Agar-agar	18g
Eau distillée	1000ml

pH=6.8 stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes

2. Milieu MRS bouillon (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de Levure	05g
Extrait de Viande	10g
Peptone	10g
Acétate de Sodium	05g
Citrate d'ammonium	02g
Glucose	20g
Phosphate di-potassique (K ₂ Hpo ₄)	02g
Sulfate de magnésium (MgSo ₄)	0.25g
Sulfate de manganèse (MnSo ₄)	0.05g
Tween 80	01ml
Eau distillée	1000ml

PH=6.8 et stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes

3. Milieu Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf déshydratée	06g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar-agar	10g
pH=7.74 et stérilisation à autoclave 15 minutes à 120°C	

Annexe 1 : le matériel utilisé

1) Les Verreries

- Pipettes graduées.
- Pipettes pasteur et micropipettes.
- Boîtes de pétries (90mm de diamètre).
- Bêchers, burette.
- Lames et lamelles.
- Ecouillons plastiques.
- Poire en plastique.
- Pipettes graduées 1 ml, 2 ml, 5 ml et 10 ml
- pince stérile.
- Cloche de Durham.
- Tubes à essai stériles.
- Tubes de centrifugation.
- Flacons de 250 ml, 500 ml et 1000 ml.

2) L'appareillage

- Agitateur magnétique thermique.
- Portoir
- Anse à boucle et anse à fil droit
- Papier aluminium
- Papier film

- Barreur magnétique.
- Bain-marie.
- Bec bunsen.
- Dessiccateur.
- Etuve.
- Microscope optique.
- Microscope électronique.
- Ph mètre.
- Centrifugeuse.
- Autoclave.
- Réfrigérateur.
- Congélateur.
- Four pasteur