



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur
Et De Le Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE: Biologie

OPTION: Microbiologie moléculaire et cellulaire

Thème

**Caractérisation phénotypique des bactéries
lactiques isolées à partir des produits laitiers
traditionnels**

Présenté par :

- M^{elle} SERAOUI Selma
- M^{elle} MAHDI Nadjat

Soutenu le : 30 / 05 /2016

Jury de soutenance:

Présidente: Pr. SEBIHI Fatima zohra (M.A.A) Univ. Abbès Laghrouour - Khenchela.
Encadreur: Pr. THABET Rachid (M.A.A) Univ. Abbès Laghrouour - Khenchela.
Examinatrice: Pr. MERABTI Rima (M.C.B) Univ. Abbès Laghrouour - Khenchela.



Promotion: Mai 2016

Remerciements

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

*Nous tenons mes plus vifs remerciements les plus chaleureux et respectueux vont au notre promoteur, Mr **THABET Rachid**, pour l'honneur qu'elles nous ont fait en dirigeant ce travail, pour leur aides, leur conseils, leur encouragements et plus particulièrement pour sa patience et sa gentillesse avec nous, tout au long de l'élaboration de ce travail malgré ses charges professionnelles.*

*A M^{ème} **SEBIHI Fatima zohra**, de bien vouloir présider ce jury et d'examiner ce travail.*

*A M^{elle} **MERABTI Rima**, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

A tous les membres du laboratoire de la biologie. Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la l'accomplissement de ce travail.

*A vous tous, un grand **Merci**.*



Dédicace



Je remercie tout d'abord "Allah"

Je dédie le fruit de mes 18 bougies d'études aux plus précieux des trésors :

Mes parents : ma mère, et mon père.

Qui m'ont appris tout ce que je sais.

Qui mon guidé vers le tunnel éclairé de savoir.

Mon plus profond respect va tout droit à mon professeur et promoteur

M^r THABET Rachid.

*A tous les membres de ma famille, mes frères et mes sœurs pour
tous ce qu'ils ont fait pour moi, pour leur patience et leur
encouragement, surtout mon frère « Saleh », et ma sœur
« Hanane », pour leur amour, leur soutien quotidien indéfectible,
leur enthousiasme pour mes travaux et pour la vie en général.*

*A tous mes enseignions, et mes amis surtout ma
chère binôme Nadjat et sa famille.*

A tous ceux que j'aime (UGEL, Roshed, Tarjih).



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

*A mon très cher père qui m' a toujours soutenu, et a été toujours présent pour moi.
A la plus chère au mondes, **ma mère** qui m' a toujours encouragé et me réconforter durant
mes études.*

*A mes sœurs : **Noussaiba, Meriam.***

*A mes frères: **Aymen, Abed almotalib.***

*À mon chère sœur **Wissem** que Dieu le garde.*

*À toute **ma famille.***

*À mon binôme **selma**, ainsi qu'à sa famille.*

*A mes chères amies : **Iman, Karima, Alima, Ibtissam, Besma ...***

*A tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du
bien de près ou de loin. Et témoignage de ma profonde affection.*

*Sans oublier **mes camarades de la promotion 2ème année Master***

Microbiologie (2015/2016).

A toutes les personnes que je porte dans mon cœur

Et qui se reconnaîtront car elles en font autant

*Je vous dédie cette thèse en guise de reconnaissance car vous m'êtes si chères que je ne peux
que vous offrir ce que j'ai appris de mieux dans ma vie.*

NADJAT

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

PREMIERE PARTIE

Revue Bibliographique

Chapitre I : Lait et produits laitiers traditionnels

I.1. Lait	3
I.1.1. Définition du lait	3
I.1.2. Composition du lait	3
I.1.2.1. L'eau	4
I.1.2.2. Les lipides	4
I.1.2.3. Les glucides	4
I.1.2.4. La matière azotée	5
I.1.2.4.1. Les protéines	5
I.1.2.4.2. Azote non protéique	6
I.1.2.5. Les matières minérales	6
I.1.2.6. Enzymes	6
I.1.2.7. Vitamines	7
I.1.2.8. Les gaz dissous	7
I.1.3. Caractéristiques physiques et chimiques du lait	8
I.1.3.1. Aspect	8
I.1.3.2. Densité	8
I.1.3.3. Acidité	8
I.1.3.4. Point de congélation	9
I.1.3.5. Point d'ébullition	9
I.1.4. Flore microbienne du lait	9
I.1.4.1. Flore originelle	9
I.1.4.2. Flore de contamination	9

I.1.5. Consommation des produits laitiers	11
I.2. Les produits laitiers traditionnels	11
I.2.1. Rayeb	12
I.2.2. Le L'ben.....	12
I.2.3. Bouhezza.....	13
I.2.4. La crème, la Zebda ou beurre frais	13
I.2.5. La Klila ou caséine desséchée.....	14
I.2.6. Fromages frais traditionnel (Djben)	14

Chapitre II: Les bactéries lactiques

II.1. Définition et caractéristiques	15
II.2. Habitat	15
II.2.1. Culture des bactéries lactiques	16
II.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement	16
II.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte.....	16
II.3. Taxonomie et classification	17
II.3.1. <i>Lactobacillus</i>	18
II.3.2. <i>Lactococcus</i>	19
II.3.3. <i>Pediococcus</i>	19
II.3.4. <i>Leuconostoc</i>	20
II.3.5. <i>Streptococcus</i>	20
II.4. Méthodes d'identification des bactéries Lactiques.....	21
II.4.1. Analyse phénotypique	22
II.4.2. Méthodes chimio-taxonomiques.....	22
II.4.2.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide(PAGE)	22
II.4.2.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse	23
II.4.3. Méthode étudiant la structure des acides nucléiques (ARN)	23
II.4.3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique	24
II.4.3.2. Hybridation ADN-ADN	24
II.4.3.3. Séquençage de l'ARNr 16S	25
II.5. Différents application des bactéries lactiques	25
II.5.1. Domaine alimentaire.....	25
II.5.2. Domaine médicale	26

II.6. Intérêt biotechnologique des bactéries lactiques	27
II.6.1. Activité acidifiante.....	27
II.6.2. Activité protéolytique	27
II.6.3. Activité lipolytique	27
II.6.4. Activité aromatiques.....	27
II.6.5. Activité antimicrobienne	28

DEUXIEME PARTIE
Partie Expérimentale
Chapitre I: Matériel et Méthodes

I.1. Matériel	29
I.1.1. Matériel biologique	29
I.1.1.1. Appareillages	29
I.1.1.2. Verreries.....	30
I.1.2.3. Milieux de culture	30
I.1.2.3.1. Milieux géloses	30
I.1.2.3.2. Milieux liquides	30
I.1.2.4. Produits chimiques et réactifs	30
I.1.2.4.1. Les colorants	30
I.1.2.4.2. Les réactifs	30
I.1.2.4.3. Les solutions	30
I.2. Méthodes.....	31
I.2.1. Isolement et identification des bactéries lactiques.....	31
I.2.1.1. Echantillonnages	31
I.2.1.2. Préparation des dilutions.....	31
I.2.1.2.1. Préparation de la solution mère.....	31
I.2.1.2.2. Préparation des dilutions décimales.....	31
I.2.1.3. Isolement des bactéries lactiques	31
I.2.1.4. Ensemencement dans un milieu sélectif	32
I.2.1.5. Purification.....	32
I.2.1.6. Conservation des souches	32
I.2.2. Identification des souches	32
I.2.2.1. Caractérisation phénotypique des souches.....	33
I.2.2.1.1. L'aspect macroscopique.....	33

I.2.2.1.2. L'aspect microscopique	33
I.2.2.1.2.1. Etat frais	33
I.2.2.1.2.2. Coloration de Gram.....	33
I.2.2.2. Identification biochimiques et physiologiques	34
I.2.2.2.1. Test de catalase	34
I.2.2.2.2. Test de Nitrate-réductase	34
I.2.2.2.3. Test de Mannitol-mobilité	34
I.2.2.2.4. Test de la production d'acétoïne	34
I.2.2.2.5. Production de CO ₂ à partir du glucose.....	35
I.2.2.2.6. Températures de croissance	35
I.2.2.2.7. Test de croissance en milieux hostiles	35
I.2.2.2.8. Profil fermentaire des sucres	36
I.2.2.2.9. Profil fermentaire sur galeries API 20E.....	36

Chapitre II: Résultats et Discussion

II.1. Isolement des bactéries lactiques.....	38
II.1.1. L'aspect macroscopique	38
II.1.1.1.1. Sur milieu solide	38
II.1.1.1.2. Sur milieu liquide	39
II.1.2. L'aspect microscopique.....	39
II.1.2.1. Etat frais.....	40
II.1.2.2. Coloration de Gram	40
II.2. Tests biochimiques et physiologiques des isolats.....	41
II.2.1. Test de catalase	41
II.2.2. Test de Nitrate-réductase	41
II.2.3. Test de Mannitol-mobilité	42
II.2.4. Test de la production d'acétoïne.....	42
II.2.5. Test de connaissance du type fermentaire	43
II.2.6. Profil fermentaire sur galeries API 20E.....	44
II.2.7. La fermentation des hydrates de carbonés.....	46
II.3. Identification des souches.....	48
II.3.1. Espèces du genre <i>Lactococcus</i>	48
II.3.1.1. <i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	48
II.3.1.2. <i>Lactococcus lactis supbs.cremoris</i>	48

II.3.2. Espèces du genre <i>Leuconostoc</i>	49
II.3.2.1. <i>Leuconostoc méseuteroïdes subsp.cremoris</i>	49
II.3.3. Espèces du genre <i>Lactobacillus</i>	50
II.3.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	50
Conclusion et perspectives	51

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Figure N°1 : Sources de contamination du lait.....	10
Figure N°2 : Fromage Bouhezza	13
Figure N°3 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	18
Figure N°4 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur le milieu M17	38
Figure N°5 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur le milieu MRS.....	38
Figure N°6 : Colonies isolées après de repiquage sur gélose M17.	39
Figure N°7 : Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide.	39
Figure N°8 : Observation microscopique des bactéries lactiques à l'état frais avec un grossissement (G: 10x40).	40
Figure N°9 : Observation microscopique des bactéries lactiques après coloration de GRAM avec un grossissement (G: 10x100) ((A) : des bâtonnets, (B) : des coques).....	40
Figure N°10 : Test Nitrate-réductase négative.....	41
Figure N°11 : Test Mannitol-mobilité.....	42
Figure N°12 : Production d'acétoïne résultat positif (anneau rouge).....	43
Figure N°13 : Type fermentaire sur milieu liquide contenant la cloche de Durham.	44
Figure N°14 : Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galerie API 20E.	44

Liste des tableaux

Tableau N°1: Composition du lait chez divers mammifères.....	4
Tableau N°2: Composition moyenne du lait en éléments minéraux dans le lait de chèvre et le lait de vache.....	6
Tableau N°3: Principales enzymes du lait.....	7
Tableau N°4: Flore microbienne du lait.....	11
Tableau N°5: Caractéristiques physico-chimiques du L'ben artisanal (g/l)	12
Tableau N°6: Caractéristiques physico-chimiques du fromage Bouhezza	13
Tableau N°7: Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	21
Tableau N°8: Répartition des prélèvements entre le mois Avril et Mai 2016	29
Tableau N°9: Critères morphologiques et le test GRAM des isolats de chaque échantillon à partir de milieu MRS et M17.....	41
Tableau N°10: Caractères préliminaires des 06 souches isolées.....	42
Tableau N°11: Résultats du test de type fermentaire	44
Tableau N°12: Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galerie API 20E.....	45
Tableau N°13: Résultats du profil fermentaire des sucres	46
Tableau N°14: Identification biochimique et physiologique des souches appartenant aux genres: <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> et <i>Lactobacillus</i>	47

Liste des abréviations

➤ Noms de genres bactériens

Lb.: *Lactobacillus*

Lc.: *Lactococcus*.

Ln.: *Leuconostoc*.

Cb.: *Carnobacterium*.

P.: *Pediococcus*.

St.: *Streptococcus*.

➤ Unités de mesures

%: Pourcentage.

°C: Degré Celsius.

D°: Degré Dornic.

T°: Température.

g: Gramme.

h, min: heure, minute.

cm, mm: Centimètre, millimètre.

l, ml: Litre, millilitre.

KJ: Kilo joule.

U: Unité.

V: Volume.

➤ Autres abréviations

ADH: Arginine déshydrogénase.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr: Acide Ribonucléique Ribosomique.

PCR: Réaction de polymérisation en chaîne.

API: Analytic Programme Index.

EPS: Exopolysaccharides.

FAO: Food and Agriculture Organization.

G+C: Guanine + Cytosine.

GRAS: Generally Regarded As Safe.

MRS: Man-Rogosa et Sharp.

OGA: Gélose glucose à l'oxytétracyclique.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

pH: Potentiel d'Hydrogène.

sp.: Espèce non précisée (inconnue).

ssp.: Sous espèce.

UFC: Unité Formant Colonie.

MG: Matière grasse.

BL: Bactéries Lactiques.

DM: Dilution mère.

AL: Acide lactique.

AC: Acides gras.

Gram⁺: GRAM positif.

Ca: Calcium.

CO₂: Dioxyde de carbone.

H₂O: Eau.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

Mg⁺²: Magnésium.

NaCl: Chlorure de sodium.

Introduction



Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, Il y'a des produits laitiers préparés par des méthodes traditionnelles, utilisant le lait de vache, ou le lait de chèvre ou également le lait de brebis. Ces produits laitiers fermenté traditionnels sont les plus souvent consommé à cause de ça richesse en matières nutritionnels: Protéines, matières grasse, glucides, sels minéraux, vitamines, et en bactéries bénéfiques...etc.

Les bactéries lactiques (BL) sont largement impliquées dans la fabrication des produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés (PLF) et leur confère une saveur typique, l'acidification, la production d'acides organiques et d'autres composés antimicrobiens, telles les bactériocines, jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes pathogènes ou des contaminants (**Desmazeaud, 1996; Cherl-Ho, 1997; Oyewole, 1997; Daly & Davis, 1998; Ouwehand, 1998**). La transformation du lactose par les ferments lactiques améliore la digestibilité du produit.

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou «probiotique», pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al., 2002**).

Notre manuscrit est structuré en deux parties, la première partie est consacrée à une revue bibliographique articulée autour de deux chapitres, le premier est de rassembler le lait et leurs compositions et leurs caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques, Ce chapitre présente également les produits laitiers traditionnels, et dans le deuxième chapitre présente le groupe des bactéries lactiques, est détaillé leurs principales caractéristiques notamment au niveau de leur taxonomie et classification, et de leur métabolisme, et traite aussi les applications des bactéries lactiques en domaine d'alimentation et de médicale. La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, ou sont détaillés les procédés d'identifications des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre de Djben, Bouhezza et l'ben, et l'étude de leurs propriétés

phénotypiques et technologiques. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont ensuite exposés dans le deuxième chapitre de cette partie et sont discutés.

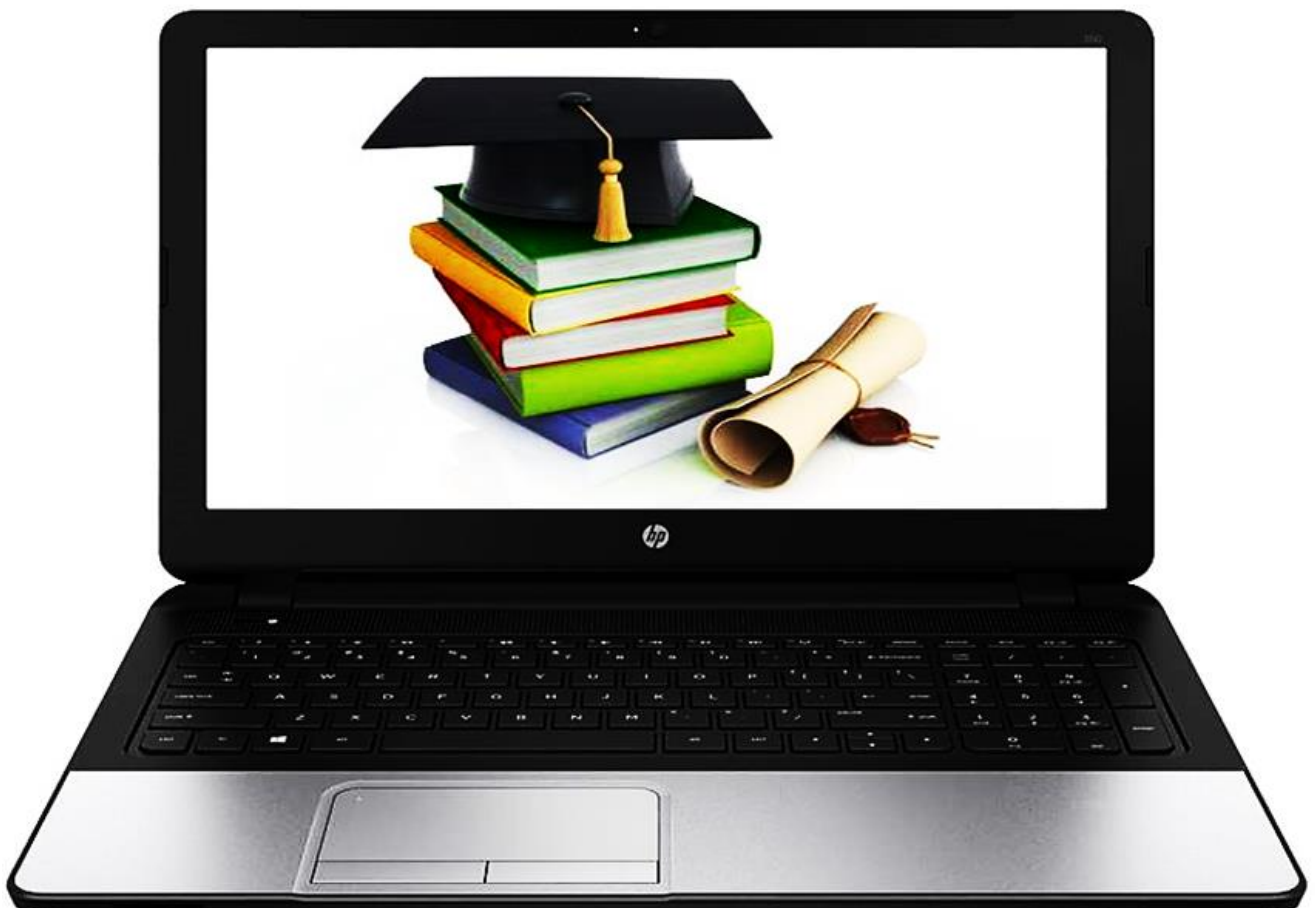
Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

L'objectif de notre travail est d'isoler des bactéries indigènes à partir des produits laitiers fermentés traditionnels (Djben, Bouhezza, L'ben), préparés à base du lait de chèvre et effectuer une identification classiques des isolats ainsi une étude des caractères phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir de ces produits.

PREMIERE PARTIE :

Revue

bibliographiques



Chapitre I :
Lait et produits laitiers
traditionnels



I.1. Lait

I.1.1. Définition du lait

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, indispensable pour le nouveau-né, comme il s'avère très bénéfique pour l'adulte. Il constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (**Chye et al., 2004**).

De tous les aliments, le lait est un aliment idéal et le plus complet. Seul, il peut couvrir tous les besoins de l'organisme durant les premiers mois de la vie. Car, il contient principalement tous les éléments nécessaires à la croissance et au développement harmonieux de l'organisme humain, en particulier les glucides, les lipides, les protéines, les vitamines et le calcium (**Jeantet et al., 2008**).

I.1.2. Composition du lait

Le lait est un substrat très riche, fournissant à l'Homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet (**Larpen, 1997**). Un litre de lait d'origine bovine contient environ 50g de lactose, 32g de protéines et 40g de matière grasse. Le potentiel énergétique d'un litre de lait est respectivement de 2720 KJ, 2090 KJ et 1460 KJ suivant qu'il est entier, demi-écrémé ou écrémé (**Mahaut et al., 2005**).

Il contient une forte proportion d'eau environ 87%, le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130g par litre). Les principaux constituants de cet extrait sec sont: Les lipides, les glucides, les protides, les vitamines et les éléments minéraux (Ca^{+2} , Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Cl^-) (**Vimahieu, 2005**).

Le lait est une émulsion de matière grasse sous forme globulaire dans un liquide qui présente des analogies avec le plasma sanguin, de ce fait que ce liquide est une suspension de matière protéique dans un sérum (solution de lactose et de sels minéraux) (**Alais et al., 1987**).

Il contient également des anticorps, des hormones et peut parfois contenir des résidus d'antibiotiques (**Vilain, 2010**).

On observe des différences de composition des laits selon les espèces (**Tableau N°1**) :

Les laits de ruminants ont une teneur élevée en protéines et se distinguent aussi par une composition importante de résidus d'acides gras (AG) à courte chaîne dans la constitution des triglycérides. Ce sont les laits de vache et de chèvre qui présente les compositions les plus équilibrées en lipides, lactose et protéines (**Mahaut et al., 2005**).

Tableau N°1: Composition du lait chez divers mammifères (Dillon, 2008)

Composition moyenne du lait (g/l)								
	Eau	Extrait Sec	Matière Grasse	Protéines			Glucide: Lactose	Matières Minérales
				totale	caséine	albumine		
Equidés								
Jument	925	100	10-15	20-22	10-12	7-10	60-65	3-5
Anesse	925	100	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Ruminante								
Vache	900	130	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	140	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10

I.1.2.1. L'eau

L'eau est le constituant le plus important du lait en proportion. Il forme un arrangement hexagonal précis lorsqu'elle atteint son point de congélation, cet arrangement fait augmenter le volume de l'eau et diminuer sa masse volumique, cette caractéristique est importante lors de la fabrication des produits laitiers glacés qui peut entraîner la formation des cristaux de glace (Vignola, 2002).

I.1.2.2. Les lipides

Tous les lipides du lait de vache existent sous forme de globule dispersés qui ressemble à une émulsion dans l'eau (Jensen & Newberg, 1995).

La matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (Vignola, 2002).

La teneur en matière grasse du lait commercialisé est réglée industriellement en laiterie par écrémage: C'est la standardisation de la matière grasse.

On trouve trois catégories de lait en fonction de leur teneur en matière grasse.

- Lait entier 3,6 g /100 ml de lait cru.
- Lait demi écrémé 1,545 à 1,845 g/100 ml de lait cru.
- Lait écrémé moins de 0,309 g/100 ml de lait cru. (Vierling, 1999).

I.1.2.3. Les glucides

Le lactose est le glucide ou l'hydrate de carbone le plus important du lait puisqu'il constitue environ 40% des solides totaux (Vignola, 2002). C'est un disaccharide constitué d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose (Debry, 2001).

Le lactose se transforme sous forme d'acide lactique par flore lactique du lait ce qui entraîne une diminution du pH. Lorsque la teneur en Acide lactique atteint 0,6 % à 2 %, les caséines du lait se déstabilisent ce qui donne la tournée du lait (**Vierling, 2003**).

Il est le constituant majeur de la matière sèche du lait, sa teneur s'élève, en moyenne, à 50g par litre de lait. D'autres sucres sont également présents mais seulement à l'état de traces (**Veisseyre, 1979**).

D'après **Luquet (1985)**, toute action bactérienne sur le lactose aboutit, soit à un abaissement du pH indispensable dans la fabrication des fromages frais et le lait fermenté, soit à une acidification pour la fabrication fromagère affinée.

I.1.2.4. La matière azotée

On distingue les protéines et les matières azotées non protéiques qui représentent successivement 95% et 5% de l'azote total du lait. L'augmentation de la teneur en protéine du lait est proportionnelle à une meilleure transformation technologique (**Karouche, 1994**).

I.1.2.4.1. Les protéines

➤ Les caséines

Les caséines représentent 78% des protéines totales du lait (**Tableau N°2**), et jouent un rôle essentiel dans les industries fromagères, le reste de la fraction protéique est de 17%, elle regroupe les albumines (13%), les globulines (2%) et les protéines mineures (2%) (**Karouche, 1994**).

Les caséines ont une teneur de 27g/l ; elles se représentent sous forme micellaire de phosphocaséinate de calcium et elles sont facilement dégradées par toutes enzymes protéolytiques. Les micelles de caséine sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux. Les quatre principales protéines contenues dans les micelles sont les caséines α_1 , α_2 , β et κ . Il existe également une γ -caséine qui est formée par l'hydrolyse de la β -caséine (**Vignola, 2002**).

➤ Les protéines de sérum

Les protéines du sérum représentent 20% des protéines totales. Les deux principales sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, les autres protéines du sérum sont les immunoglobulines, le sérum albumine, et la lactoferrine. En plus, différents enzymes sont présents dans le sérum (**Vignola, 2002**).

I.1.2.4.2. Azote non protéique

Il représente en moyenne 5 % de l'azote total du lait et se présente sous forme de :

- Urée.
- Créatine, créatinine.
- Ammoniaque.
- Acides aminés libres.
- Vitamines.
- Nucléotides. (**Luquet, 1985**)

I.1.2.5. Les matières minérales

Les minéraux, entièrement apportés par notre alimentation, ont un rôle structural et fonctionnel. Ils sont souvent impliqués dans des mécanismes physiologiques (régulation nerveuse ou enzymatique, contraction musculaire, etc. ...) (**Jeantet et al., 2008**).

La quantité des minéraux contenus dans le lait après incinération varie de 0,60 à 0,90%. Ils prennent plusieurs formes, ce sont le plus souvent des sels, des bases et des acides (**Vignola, 2002**).

Les minéraux les plus importants du lait, le calcium (Ca), le phosphore (P) et le magnésium (Mg), sont aussi les trois principaux constituants minéraux des os (**Jeantet et al., 2008**).

Tableau N°2: Composition moyenne du lait en éléments minéraux dans le lait de chèvre et le lait de vache (**Gueguen et al., 1996**)

Composants mg/l	Chèvre	Vache
Calcium	1260	1200
Phosphore	970	920
Potassium	1900	1500
Sodium	380	450
Chlore	1600	1100
Magnésium	130	110

I.1.2.6. Enzymes

Les enzymes sont définis par **Luquet (1985)** comme étant des substances de nature protéique, qui agissent comme catalyseurs dans les réactions biochimiques.

Le lait contient un très grand nombre d'enzymes, dont 60 ont été répertoriées. Parmi celles, présentant un intérêt particulier (**Tableau N°3**) on peut citer les principales:

Tableau N°3 : Principales enzymes du lait (Mathieu, 1998)

	Répartition	PH Optimum	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
Oxydoréductases			
Lactoperoxydase	Lactosérum	6,5-6,8	80 000
Xanthine oxydase	Membrane du GG	7	600 000
Catalase	Membrane du GG	6,8-7	240 000
Hydrolases			
Phosphate alcaline	Membrane du GG	7-10	170 000
Lysozyme	Lactosérum	8	14 000-18 000
Lipase naturelle	Caséine	7-9	50 000
Protéase alcaline	Caséine	7,5-8	48 000
Protéase acide	Caséine	4	36 000

I.1.2.7. Vitamines

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires (Luquet, 1990).

On classe les vitamines en deux grandes catégories:

- Les vitamines hydrosolubles du groupe B et vitamine C de la phase aqueuse du lait.
- Les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres sont à sa périphérie (Debry, 2001).

D'une manière générale, le lait ne permet pas de satisfaire tous les besoins vitaminiques: C'est une source notable en vitamines A, B12, et B2, dans une moindre mesure en vitamines B1, B6, en revanche il ne contient que peu de vitamine E, B9 et H (Debry, 2006).

I.1.2.8. Les gaz dissous

Le lait contient en moyenne 6% en volume de gaz dissous essentiellement dioxyde de Carbone, Azote et Oxygène. Les quantités des gaz dissous sont en fonction de leur solubilité dans l'eau et de la composition de l'air (Mathieu, 1998).

I.1.3. Caractéristiques physiques et chimiques du lait

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races (**Rahali & Menard, 1991**).

Les principales propriétés physico-chimiques du lait sont représentées par sa densité, son point de congélation, son point d'ébullition et son acidité. Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses). Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6.5 et 6.8 pour le lait de vache et entre 6.2 et 6.82 pour le lait de chèvre). Par contre, il est légèrement basique pour le lait humain (pH compris entre 7 et 7.5), l'acidité du lait augmente avec le temps suite à la transformation du lactose en acide lactique. Cette acidité permet d'avoir un indicateur du degré de conservation. Pour cela, on utilise le degré Dornic (°D) (**Hebboul et al., 2005**).

I.1.3.1. Aspect

Le lait est un liquide blanc et opaque; il est deux fois plus visqueux que l'eau, sa saveur est légèrement sucrée et son odeur peu accentuée. Sa couleur est plus ou moins jaunâtre selon la teneur en matière grasse, en β -carotène, goût variable agréable et douceâtre selon les espèces animales (**Veisseyre, 1979**).

I.1.3.2. Densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (**Vierling, 2008**).

I.1.3.3. Acidité

- **Acidité apparente ou naturelle:** Elle est due principalement à la présence: Des protéines, surtout les caséines et lactalbumine, des substances minérales telles que les phosphates et le CO₂, et des acides organiques, le plus souvent l'acide citrique. Elle varie entre 0.13 et 0.17 % d'équivalent d'acide lactique.
- **Acidité développée:** Elle est développée par l'acide lactique, dont le lait frais n'en contient qu'environ 0.002%. En se développant, les bactéries lactiques vont former de l'acide lactique par fermentation du lactose: Nouvelle acidité qui conduit à la dénaturation des protéines.
- **Acidité titrable:** C'est une mesure des deux acidités définies précédemment:

Acidité titrable = Acidité naturelle + Acidité développée

Cette acidité s'exprime aussi en degré Dornic (°D) (**Vignola, 2002**).

I.1.3.4. Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau, puisque la présence des solides solubilisés abaisse le point de congélation, il peut varier de -0,53 à -0,575°C avec une moyenne de -0,555°C, un point de congélation supérieur à -0,530 °C permet de soupçonner une addition d'eau au lait, on vérifie le point de congélation du lait à l'aide d'une cryoscopie (**Vignola, 2002**).

I.1.3.5. Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés, il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminue avec la pression, on applique ce principe dans le procédé de concentration du lait (**Amiot et al., 2002**).

I.1.4. Flore microbienne du lait

Le lait est, de par sa composition, un aliment de choix, il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau, son pH est de 6,6. Il va être un substrat très favorable au développement des micro-organismes (**Guiraud & Galzy, 1980**).

On répartit les micro-organismes du lait selon leur importance, en deux grandes classes: La flore indigène ou originelle et la flore de contamination (**Vignola, 2002**).

I.1.4.1. Flore originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions à partir d'un animal sain (**Guiraud, 2003**).

La flore indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, ces micro-organismes plus ou moins abondants sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs, le lait qui sort du pis de la vache est pratiquement stérile. Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des micro-organismes mésophiles (**Amoit et al., 2002**).

I.1.4.3.2. Flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des micro-organismes ajoutés au 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 capable de provoquer des maladies chez les personnes qui consomment ces produits laitiers. On considère comme flore de contamination d'altération et pathogène du lait

l'ensemble des micro-organismes qui s'ajoutent au lait extrait du pis de la vache (**Carol & Vignola, 2002**).

Ces microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade: Ils sont généralement pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infection du pis (*Streptocoques pyogènes, Corynebactéries pyogènes, Staphylocoques*). Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en absence d'anomalies du pis (*Brucella* (agent de fièvre de malt), exceptionnellement *Mycobacterium* (agent de la tuberculose), *Bacillus anthracis* (agent du charbon), et quelque virus) (**Guiraud, 1998**).

Les principaux micro-organismes pathogènes associés aux produits laitiers sont *Salmonella, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum et Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica* (**Vignola, 2002**).

Le lait peut se contaminer par des apports microbiens d'origines divers :

- **Fèces et téguments de l'animal:** Coliformes, Entérocoques, *Clostridium*, éventuellement entérobactéries pathogènes (*Salmonella, Shigella, Yersinia*)...etc.
- **Sol:** *Streptomyces, Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques, ...etc.
- **Litière et aliments:** Flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium butyriques* (ensilages).
- **Air et eau :** flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, ...etc.
- **Équipement de traite et de stockage du lait:** Microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc*, etc. Cette flore est souvent spécifique d'une usine.
- **Manipulateurs:** Staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectoration, de contamination fécale, ...etc.
- **Vecteurs divers (insectes en particulier):** Flore de contamination fécale. Parmi ces microorganismes, il en est d'inoffensifs, d'autres dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait (**Guiraud, 2003**).

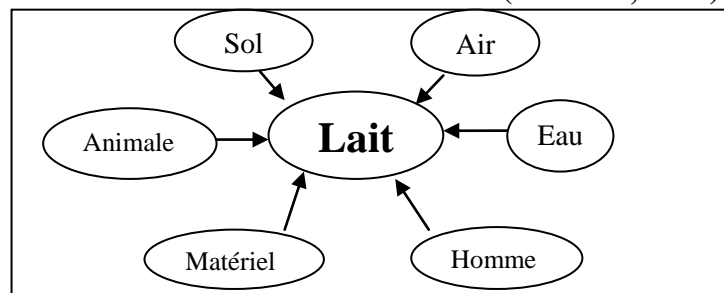


Figure N°1: Sources de contamination du lait (**Guiraud & Rosec, 2003**).

Tableau N°4: Flore microbienne du lait (Leyral & Vierling, 2001)

Flore originale		Flore de contamination	
Bactéries des canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
Lactobacilles	<i>Pseudomonas</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Streptocoques lactiques	<i>Flavobacterium</i>	Coliformes fécaux	<i>Brucella</i>
	Entérobactéries	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	Microcoques	<i>Yersinia</i>	
	Corynébactéries	<i>Campylobacter</i>	
	<i>Bacillus</i>		
	<i>Streptocoques faecalis</i>		
	<i>Clostridium</i>		

I.1.5. Consommation des produits laitiers

Le lait est un élément essentiel de la nutrition humaine. Il est une source très essentielle de Ca, P, de la riboflavine, la vitamine B12, et une grande majorité de protéine, sucre, lipides de qualité, avec tous ces éléments nutritifs exige sa nécessité en matière de nutrition humaine (Kaan-Tekinsen *et al.*, 2007).

Les besoins algériens en lait et produits laitiers sont très importants. Avec une consommation majeure de 110 litres de lait par an par habitant, l'Algérie en est le plus gros consommateur au niveau maghrébin, le taux de croissance animal de la production du lait cru est resté relativement faible, compte tenu du potentiel des bassins laitiers existants et comparativement à l'essor de la demande en lait et produits laitiers qui ne cesse d'augmenter, en relation avec le soutien de l'état aux prix à la consommation au lait industriel (Temmar, 2007).

I.2. Les produits laitiers traditionnels

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons, et la difficulté de sa préservation sous la forme fraîche a conduit au développement des technologies de production traditionnelles (Dharam & Narender, 2007).

La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (Shan-Na *et al.*, 2011).

La transformation du lait de chèvre en produits laitiers traditionnels algériens, tels que Rayeb, L'ben et Djben est réalisée via une fermentation spontanée sans l'ajout d'une entrée sélectionnée (**Badis et al., 2004**). Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien et ont une grande importance culturelle médicinale, et économique ils ont être développée sur un longue période avec les compétences culinaire de fermes en plus de la conservation des solide du lait pour plus longuement à température ambiante (**Lahsaoui, 2009**).

I.2.1. Rayeb

Le Rayeb est un produit qui n'aura aucun traitement thermique préalable et laissé s'acidifier par fermentation spontanée jusqu'à l'obtention d'un caillé (**Touati, 1990**).

Le Lait de la traite du soir est versé dans un récipient ou dans une «Chekoua» et laissé coaguler. En été, il est abandonné à température ambiante, une nuit, alors qu'en hiver, il est laissé près d'une source de chaleur et le temps de coagulation est plus long. Le produit obtenu est un gel fragile, friable, exsudant une quantité de son lactosérum dont l'importance est liée avec son acidité (**Aissaoui, 2003**).

I.2.2. Le L'ben

Le l'ben c'est du lait débarrassé de sa crème, et qui a subi ensuite une fermentation lactique, l'acide lactique produit provient du dédoublement de la molécule de lactose par l'action du bacille lactique. L'acide lactique à la propriété, lorsqu'il se forme en excès, d'amener la coagulation de la caséine du lait. Cette coagulation est d'autant plus active que la température ambiante est plus élevée (**Bendanou, 1981**).

Il est fabriqué à partir de lait de vache, brebis et de chèvre. Le lait subit une acidification spontanée par sa flore original jusqu'à coagulation. Le caillé obtenu est introduit dans la Chekoua ou le Zeer ou il subit une forte agitation ou barattage.

Le l'ben est considéré comme une boisson lactée très rafraîchissante surtout en été. En Algérie, le l'ben entre dans la fabrication de différents produits laitiers. En effet, c'est la matière première de la fabrication des fromages de Bouhezza, et klila (**Aissaoui-Zitoun, 2003**).

Tableau N°5: Caractéristiques physico-chimiques du L'ben artisanal (g/l) (**Aissaoui, 2004**)

Constituants	Protéine	Lipide	Chlorure	Acide lactique	Extrait sec
Teneurs (g/l)	3.44	9.14	1.6	82.6	90.2

I.2.3. Bouhezza

C'est un fromage fermier fermenté à égouttage spontané, fabriqué à partir de lait de chèvre, de vache ou de brebis baratté et écrémé (l'ben) (Touati, 1990), il est très répandu dans l'est algérien plus précisément dans les régions d'OUM BOUAGHI, KHENCHELA, et dans certains régions de BATNA (Mekentichi, 2003).

Le salage, l'égouttage et l'affinage du Bouhezza sont réalisés simultanément dans une «Chekoua», préalablement traitée aux tannins pendant 3 à 4 mois. Au stade de la consommation le fromage est pétri avec incorporation de poudre de piment rouge, ce qui lui donne une caractéristique particulière (Lemouchi, 2008).

Le fromage Bouhezza a un gout acidulé fort caractéristique au fromage (Aissaoui, 2003).



Figure N°2: Fromage Bouhezza (Aissaoui Zitoun & Zidoune, 2006).

Tableau N°6: Caractéristiques physico-chimiques du fromage Bouhezza (Aissaoui Zitoun & Zidoune, 2006)

	pH	Acidité	EST	MG/EST	MAT/EST	NST/NT	NaCl
Bouhezza	4	2,08 ±0,14	35,86±0,8	30,2	0,08	0,38	2,36±0,06

EST : Extrait sec total. **NaCl**: Chlorures, Lactates: exprimé en acide lactiques (ces valeurs sont en g pour cent g de produit frais). **MG**: Matière grasse. **NST**: Azote soluble à pH 4,6. **MAT**: matière azotée total.

I.2.4. La crème, la Zebda ou beurre frais

Selon la norme du Codex Alimentaire, le beurre est un produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans huile. Il est obtenu par barattage de la crème du lait (Luquet & Corrieu, 2005).

Elle contient presque la totalité des lipides du lait et de 2,7 g de protéines pour 100 g, et fabriqué à partir de la crème (le barattage), et il contient 0,8 g de protéines pour 100g (**Vilain, 2010**).

I.2.5. La Klila ou caséine desséchée

C'est un fromage frais préparé à partir du L'ben. Le L'ben subit un chauffage modéré pendant environ 15 mn pour faciliter l'agglomération des caséines et la séparation du lactosérum.

Le caillé obtenu est filtré dans une mousseline "Chèche " jusqu'à égouttage complet. Pour certaines régions de l'Est Algérien, l'égouttage est amélioré par pressage à l'aide d'une pierre (**Hellal, 2001**).

Le fromage obtenu est consommée tel qu'il est frais au après un séchage il est utilisée comme un ingrédient après réhydratation dans les préparations culinaires traditionnels (**Mennane et al., 2007**).

I.2.6. Fromages frais traditionnel (Djben)

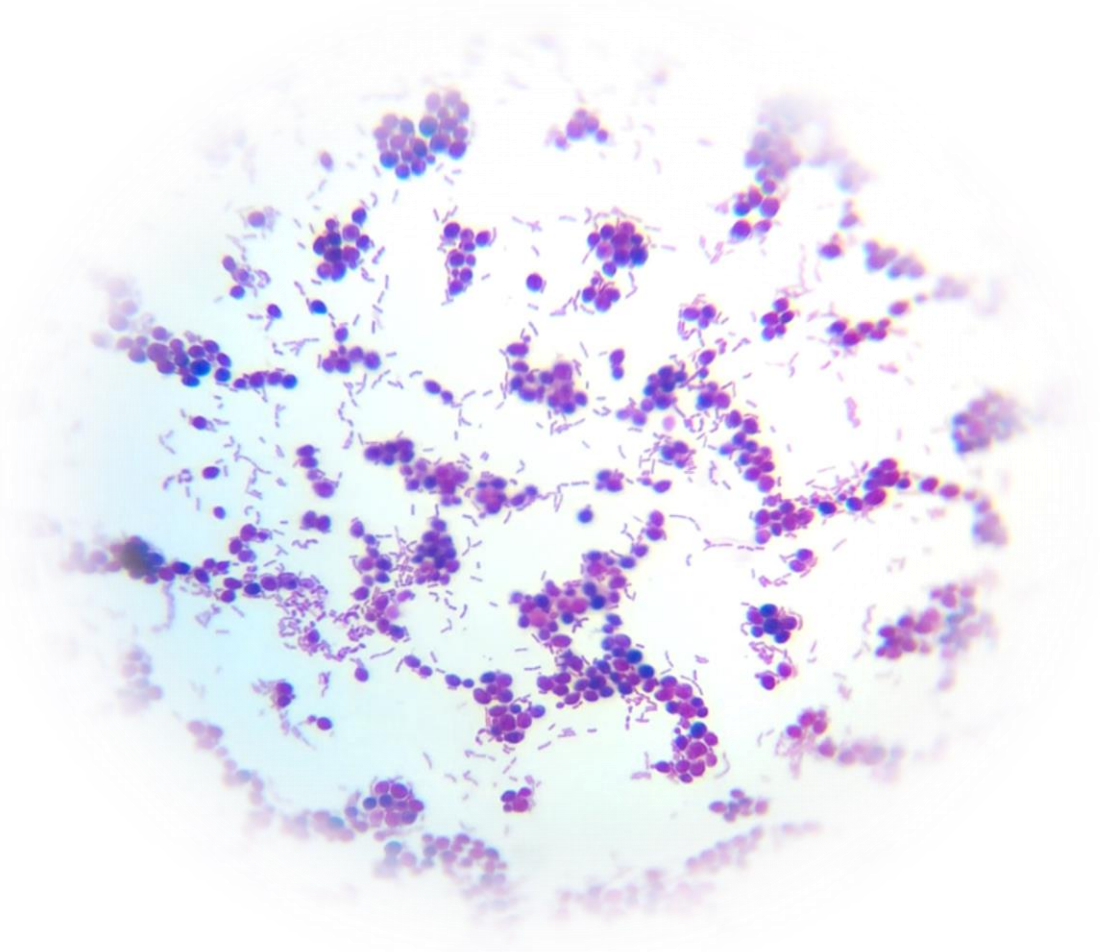
Le Djben est connu dans plusieurs régions d'Algérie, spécialement dans le Nord. C'est un fromage frais obtenu par coagulation enzymatique (présure extrait à partir de la caillette de veau). Le lait destiné à la fabrication est chauffé, une fois tiède, un fragment de caillette bovine est macéré dans le lait. Après coagulation du lait été égoutté, le caillé ainsi obtenu peut être salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatiques (**Abdelaziz & Ait Kaci, 1992**).

Selon la norme du Codex Alimentaire et la norme internationale FAO/OMS, le fromage frais ou non affiné est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française, la dénomination «fromage» est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage (**Luquet & Corrieu, 2005**).

Traditionnellement, le fromage Djben est fabriqué avec du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*), ou d'artichaut (*Cynara scolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille (**Nouani, 2009**). Peut-être d'origine animale (caillette de veau enduite de sel ou d'Alun puis séché).

Le fromage ainsi obtenu peut être consommé tel qu'il est, salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatisants (**Hellal, 2001**).

Chapitre II :
Les bactéries lactiques



II.1. Définition et caractéristiques

Comme toutes les bactéries, les bactéries lactiques sont des microorganismes vivants et unicellulaires (**Luquet & Corrieu, 2008**), hétérotrophes et chémoorganotrophes, non pathogènes, formant 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 comme produit majeur du métabolisme (**Badis et al., 2005**).

Ces bactéries sont généralement à Gram positif (G+), dont la teneur en Guanine et Cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, immobiles, aéro-anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5 (**Salminen et al., 2004; König & Fröhlich, 2009; Pringsulaka et al., 2011**).

Les bactéries lactiques peuvent être avoir différentes formes: Sphérique (coques/genre *Streptococcus* et *Lactococcus*...), en bâtonnets (bacilles/genre *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc sp*) (**Luquet & Corrieu, 2005; Galvez et al., 2011**).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole, ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004**).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Dortu & Thonart, 2009**).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes homofermentaires et hétérofermentaires basées sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose.

- **Homofermentaires:** L'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- **Hétérofermentaires:** La fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés: Ethanol, CO₂ et autres acides organiques (**Priyanka & Prakash, 2009**).

II.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes: Elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme les produits laitiers, la viande, les végétaux, les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Stiles et al., 1997**).

II.2.1. Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (**Hammes & Hertel, 2006**).

II.2.2. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages,...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*; *Lactococcus lactis* et/ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments « starter culture » par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

Les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides (Acidotolérantes), en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes*. Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'Homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (**Galvez et al., 2011**).

II.2.3. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastrointestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis*, pathogène responsable de la trichomonas vaginale (**Björkroth & Holzapfel, 2006**).

II.3. Taxonomie et classification

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en **1919** par **Orla Jensen**. Les marqueurs chimio-taxonomiques tels que les compositions des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification (**Krieg, 2001**).

Les nouvelles techniques pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment en causes et/ou complètent les approches phénotypiques anciennement utilisées (**Garrity et al., 2008**), qui sont pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à: Fermenter les hydrates de carbone, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes, la composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme, 1996; Stiles & Holzopfel, 1997; Ho et al., 2007; Hadeif, 2012**).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50CH (**Curk et al., 1993**).

L'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (**Salminen et al., 2004**).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (**Collins et al., 1993; Ho et al., 2007**).

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (**Drouault & Corthier, 2001**).

Récemment 15 genres lactiques ont été décrits : (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Ermecoccus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*) (**Leisner et al., 2000**).

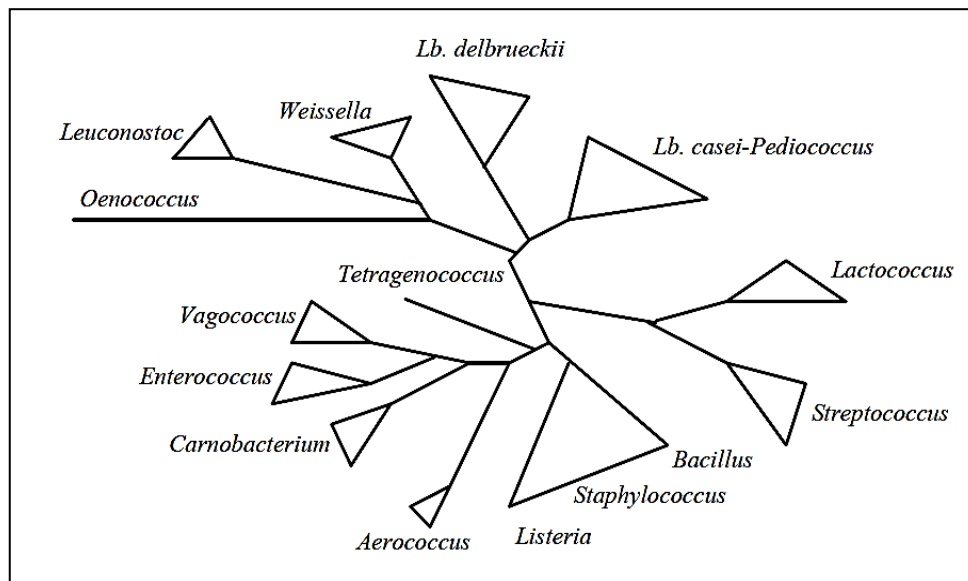


Figure N°3 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Lahtinen *et al.*, 2012).

II.3.1. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques de la famille des *Lactobacillaceae* (Axelsson, 1993; Guiraud, 2003).

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le G+C varie de 33 % à 55%), il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement. Les lactobacilles sont des bacilles Gram positif, non mobiles, non sporulants, se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies. Bien que certains travaux aient révélé la présence d'une catalase chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Rochat *et al.*, 2006).

Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002) :

- **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*.

II.3.2. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* 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).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis ssp. lactis biovardiacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6 (Dellaglio *et al.*, 1994).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces: *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris* et *Lc. lactis ssp. hordniae* (Pot, 2008).

II.3.3. *Pediococcus*

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).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Tosukhowong *et al.*, 2005).

II.3.4. *Leuconostoc*

La famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétérofermentaires (**Gonzalez et al., 2000**).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (**Ogier et al., 2008**).

Ils sont présents en nombres très variables (de 10³ à 10⁹ germes par gramme), et sont surtout abondants dans les fromages au lait cru (**Prescott et al, 2003**).

Les niveaux détectés dans les laits sont très variables: de moins de 100 UFC.ml⁻¹ jusqu'à plus de 10³UFC.ml⁻¹ (**Casalta, 2003**).

Le rôle des *Leuconostoc* dans la formation de l'arôme et la texture des fromages est important (**Hemme & Foucaud-Scheunmann, 2004**).

Ce genre comprend les espèces suivantes: *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèces: *Mesenteroides cremoris* et *Mesenteroides dextransicum* et *Ln. lactis* et *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (**Laease, 2005**).

II.3.5. *Streptococcus*

Ce genre regroupe de nombreuses bactéries en forme de coques et ayant pour principales caractéristiques : Gram+, asporogènes, métabolisme homofermentaire produisant principalement de l'acide lactique et un contenu en CG% de 35% à 46%. La présence dans leur enveloppe d'antigène spécifique a été d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupes sérologiques de **Lancefield (1933) (Collins et al., 1987)**.

Schleifer et Kilper-Balz (1987) ont proposé de subdiviser les *Streptococcus* en 4 genres. Il s'agit de *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Enterococcus*. Le genre *Streptococcus sensu stricto* comprend la majorité des espèces et en particulier:

- **Le groupe pyogènes:** Comprend 5 espèces α et/ou β hémolytique, pathogènes pour l'homme et/ou les animaux.
- **Le groupe oralis comprend:** *Sc. viridans*, *Sc. mitior*, *Sc. intermedius*, *Sc. pneumoniae* souvent α hémolytiques pathogènes opportunistes.
- **Le groupe des autres streptocoques** et en particulier *Sc. salivarius subsp. salivarius* qui est étroitement apparenté à *Sc. thermophilus*. C'est la raison pour laquelle **Farrow et Collins (1984)**, proposent de considérer *Sc. thermophilus* comme sous espèce de *Sc. salivarius*. Cette proposition était renforcée par les résultats d'étude de l'hybridation ADN / ADN (**Axelsson, 1998**).

Tableau N°7: Les principaux genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (**Laurent et al., 1998**)

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	G1: 23 G2: 16 G3: 22
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	14
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	8

II.4. Méthodes d'identification des bactéries Lactiques

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques (acides gras cellulaires), analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (**Holzappel et al., 2001**).

Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique. Les méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, RAPD (Random amplified polymorphic DNA), PCR-inverse, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (**Temmerman et al., 2004**).

Ci-dessous, un aperçu concis des techniques les plus importantes utilisées pour la classification et l'identification des bactéries lactiques.

II.4.1. Analyse phénotypique

Les méthodes phénotypiques sont toujours utilisées dans les laboratoires de microbiologie alimentaire appliquée. Différents tests clefs ont été largement adoptés et de nos jours, les caractérisations morphologiques ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques, biochimiques et chimiotaxonomiques sont pratiquées. Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et au sel ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (**Gevers, 2002**).

Parmi les méthodes biochimiques utilisées, les microméthodes ont connu un développement important, avec la commercialisation de systèmes d'identification associant, pour un groupe bactérien donné, une galerie miniaturisée de tests biochimiques, et des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus (**De Roissart & Luquet, 1994**).

La première galerie biochimique miniaturisée destinée à l'identification des bactéries lactiques a été la galerie API (Analytic Programme Index) 50 CHL, commercialisée en 1970 pour l'étude des souches du genre *Lactobacillus*, puis rapidement étendue à d'autres genres (*Leuconostoc* et *Lactococcus*). Cette technique nécessite une durée d'incubation plus ou moins longue (12 heures à 48 heures) mais exige l'emploi d'un inoculum de faible charge bactérienne.

La comparaison des profils des protéines totales de la cellule obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), s'est révélée être extrêmement fiable pour l'identification au niveau de l'espèce voir même de la sous-espèce, à condition d'avoir une base de données des profils protéiques numérisés et normalisés de toutes les espèces connues de bactéries lactiques (**Vandamme et al., 1996**).

Pour certaines espèces, le pouvoir discriminatoire de cette technique est limité, c'est le cas du complexe *Lactobacillus acidophilus* (**Gancheva et al., 1999**), et les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* et, *Lactobacillus paraplantarum* (**Torriani et al., 2001**).

II.4.2. Méthodes chimio-taxonomiques

II.4.2.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

Le principe de cette méthode repose sur le fait que deux souches bactériennes possèdent un niveau d'hybridation ADN-ADN de 90 à 100% et cultivées dans les mêmes conditions, produisent un même ensemble de protéines visualisé sous la forme d'une empreinte.

Ainsi, leurs électrophorégrammes (ou profils protéiques) résultant de la séparation du mélange de protéines cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) ne présenteront que des différences minimales. Les souches partageant une homologie d'ADN d'au moins 70%, présentent des empreintes protéiques ayant aussi un niveau élevé de similitude et produisent des électrophorégrammes encore assez semblables (**Kersters, 1985**).

Des banques de profils ont été créées grâce au développement d'un protocole très standardisé (**Pot et al., 1994**), et d'outils informatiques adaptés facilitant les comparaisons et les regroupements à l'aide de coefficients de similitude (**Vauterin, 1992**).

L'électrophorèse des protéines est donc une méthode très sensible qui permet de différencier les bactéries lactiques à un niveau taxonomique fin, en l'occurrence la sous-espèce ou la souche (**Gatti et al., 2001**).

II.4.2.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des acides gras (AG) des parois bactériennes par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse est une méthode rapide, sensible et sélective, permettant l'identification des bactéries lactiques moyennant une comparaison des chromatogrammes obtenus à des banques de données de profils d'AG (**Dykes et al., 1995**). Néanmoins les conditions de culture (apport nutritionnel, température de croissance, âge de la culture) doivent être bien établies et normalisées (**Gilarova et al., 1994**).

Les bactéries lactiques contiennent différents types d'AG. Les lactobacilles et les pédiocoques sont principalement caractérisés par une prépondérance d'AG à longues chaînes linéaires saturées ou mono-insaturées, très souvent à nombre pair d'atomes de carbone et d'AG cyclopropanoïques. Les AG à chaînes ramifiées et les AG hydroxyliques ou polyinsaturés sont absents de ce type de bactéries.

Cette méthode a été utilisée pour la différenciation entre *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* isolées de produits carnés fermentés (**Rementzis & Samelis, 1996**).

II.4.3. Méthode étudiant la structure des acides nucléiques

Les techniques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencé par les conditions de culture (**Gevers, 2002**).

Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Toutefois, il existe quelques limites (**Rossello-Mora & Amann, 2001**). A titre d'exemple certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les mêmes séquences de l'ADNr 16S (**Fox et al., 1992**).

II.4.3.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique

L'intérêt de la mesure du contenu en G+C (mol%) est lié à la grande diversité de la composition en guanine et en cytosine de l'ADN des microorganismes, puisqu'elle va de 25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micococcus luteus* (**Muto & Osawa, 1987**).

On peut conclure que deux isolats bactériens sont d'espèces différentes que si la différence de leur contenu G+C est d'au moins 5%; toutefois, deux souches ayant le même G+C ne sont pas forcément semblables parce que cette valeur ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides dans l'ADN.

Le contenu GC des bactéries lactiques est généralement inférieur à 50 mol% étant donné qu'elles appartiennent au phylum *Clostridium*. Le genre *Lactobacillus* montre une grande diversité génétique. En effet, le contenu GC varie entre un minimum de 32% pour *Lactobacillus mali* et un maximum de 54% pour *Lactobacillus fermentum* ou *Lactobacillus pontis*. Cette amplitude est deux fois plus grande que le seuil de 10% proposé pour l'identité du genre (**Schleifer & Stackebrandt, 1983**).

En outre, ces contenus GC maximum excèdent les 50 mol% proposés comme seuil de séparation entre les phylums des *Clostridium* et des Actinomyces (**Champonier-Verges et al., 2002**).

II.4.3.2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules d'ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de chaque souche) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux génomes. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique est également un paramètre important. Car, elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex. Il est généralement admis qu'au-dessus de 70% d'homologie, deux souches font partie de la même espèce. Néanmoins, le niveau exact permettant d'affirmer que deux bactéries sont d'espèces différentes varie selon le genre bactérien (**Zakrzewska-Czerwinska et al., 1988**).

Cette méthode a été utilisée pour l'identification des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande. En l'occurrence *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Lb.*

alimentarius, *Weissella halotolerans*, *W. viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Cb. divergens* et *Cb. Piscicola* (Montel et al., 1991).

II.4.3.3. Séquençage de l'ARNr 16S

Les séquences ribosomiques reflètent le génotype des bactéries. La stratégie de séquencer l'ARNr contenant des morceaux de régions variables et d'effectuer une analyse comparative de la séquence avec celles contenues dans des bases de données déjà existantes permet de déterminer les régions présentant une variabilité. Ces régions variables sont utilisées pour la synthèse de sondes oligonucléotidiques ou amorces PCR. C'est principalement l'ARNr 16S pour lequel un grand nombre de séquences sont données. Bien que la région de l'ARNr 16S spécifique à l'espèce soit localisée dans les régions V1 à V3, l'identification est plus précise, si tout le gène est séquencé (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Dans certains cas, l'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S (Intergenic Spacer Region = ITS) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr 16S lui-même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. pseudoplantarum* ou *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* peuvent être discriminées (Berthier & Ehrlich, 1998).

D'autres gènes spécifiques au genre (Ke et al., 1999) ou à l'espèce (Dutka-Malen et al., 1995) ont été séquencés.

Ainsi, des amorces espèce-spécifiques ont été développées pour la plupart des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande et des produits carnés: *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* (Berthier & Ehrlich, 1998), *Cb. divergens*, *Cb. piscicola* (Rachman et al., 2004), *Ec. faecium* (Dutka-Malen et al., 1995), *Ln. mesentroides subsp. mesentroides* (Moschetti et al., 2000).

II.5. Différents application des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications (Streit et al., 2007).

II.5.1. Domaine alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008). Le vin, les poissons, les viandes, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés, et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques; grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (**Dortu & Thonart, 2009**).

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères: Absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Marth & Steele, 2001**).

➤ **Rôle sur la structure et la texture**

Dans les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un callé plus ou moins fermes selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé, Kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée, l'utilisation de souches plus ou moins acidifiantes peut être combinée à celle de souches productrices de polysaccharides (**Sutra & Federighi, 1998**).

➤ **Rôle dans la conservation**

- **Production d'acide lactique:** Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.
- **Production de bactériocines:** Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur les bactéries à Gram positif (**Laurent et al., 1998**).

II.5.2. Domaine médicale

Les bactéries lactiques assurent:

- L'amélioration de la digestibilité du lactose.
- L'abaissement du taux de cholestérol sanguin.
- L'activation du système immunitaire.
- L'inactivation de composés toxiques et la protection contre certaines infections intestinales. (**Laurant et al., 1998**).
- La production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (**Rodriguez et al., 2003**).
- Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al., 2008**).

- Capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**).

II.6. Intérêt biotechnologique des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée, est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

II.6.1. Activité acidifiante

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone (**Badis et al., 2004**). La transformation du lactose ou d'un autre sucre assimilable en acide lactique, conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes (**Frank & Hassan, 1998; Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 1998**).

II.6.2. Activité protéolytique

Les activités protéolytiques et peptidasique sont importantes. Car, elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu (**Beal et al., 2008**).

La fermentation, au cours de laquelle plusieurs transformations physiques, biochimiques et microbiologiques se déroulent, est une étape cruciale dans le processus de fabrication des saucisses fermentées. En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur les protéines myofibrillaires. Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (**Ammor et al., 2005**).

II.6.3. Activité lipolytique

L'activité lipolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (**Beal et al., 2008**). La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acide gras libre des produits fermentés, réduisant de ce fait la durée de leur maturation mais sans en améliorer systématiquement leur saveur (**Zalacain et al., 1996**).

II.6.4. Activité aromatiques

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (**Georgalaki et al., 2002; Francois et al., 2007**).

II.6.5. 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. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (**Alakomi et al., 2000; Ammor et al., 2006**).
- **Les bactériocines:** Produites par les bactéries lactiques, sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont: La nisine, la diplococcine, l'acidophiline et labulgaricane (**Ogunbanwo et al., 2003; Dortu & Thonart, 2009**). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009**).

DEUXIEME PARTIE :

Partie

Expérimentale



Chapitre I :

Matériel et méthodes



Les échantillons de (Djben, Bouhezza, L'ben) analysés sont pris directement du marché, il s'agit de 05 prélèvements puis transportés jusqu'au laboratoire dans des conditions d'aseptisation satisfaisante.

Ces prélèvements ont eu lieu entre le mois Avril et Mai 2016 (**Tableau 8**).

Tableau N°8: Répartition des prélèvements entre le mois avril et mai 2016

Prélèvement	Date
1 ^{er} (Djben)	15/04/2016
2 ^{ème} (Djben)	18/04/2016
3 ^{ème} (Bouhezza)	22/04/2016
4 ^{ème} (Bouhezza)	26/04/2016
5 ^{ème} (L'ben)	02/05/2016

La partie expérimentale est réalisée au niveau du laboratoire de faculté de science de la nature et de la vie, **Université Abbès Laghrour - Khenchela-**.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

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

1.1.1.1. Appareillages

Les principaux appareils utilisés sont :

- Anse de platine.
- Autoclave.
- Bain-marie.
- Balance de précision.
- Bec bunsen.
- Etuves pour l'incubation.
- Microscope.
- Plaque chauffante.
- Portoirs.
- Réfrigérateur.

I.1.1.2. Verreries

- Béchers.
- Boîte de pétri en plastique.
- Burette graduée en 0.5 ml.
- Des tubes à essais.
- Entonnoir.
- Flacons de 500 ml
- Lames et lamelles.
- Pipettes pasteur stériles.
- Pipettes graduée.
- Tubes à essai.
- Verre de montre.

I.1.2.3. Milieux de culture

Les milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale sont:

I.1.2.3.1. Milieux géloses

- MRS (de Man-Rogosa et Sharp) gélose.
- M 17 gélose.
- Mannitol-mobilité.

La composition de ces milieux de cultures est indiquée en **annexe N°2**

I.1.2.3.2. Milieux liquides

- Bouillon nitrate.
- Bouillon MRS.
- Bouillon nutritif.
- Bouillon M17.
- Bouillon Clark et lubs.
- Bouillon Elliker

I.1.2.4. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

I.1.2.4.1. Les colorants : Violet de Gentiane, Solution de Fuchsine de Ziehl.

I.1.2.4.2. Les réactifs : Le réactif de Clark et lubs (VPI et VPII), réactif de Nitrate (Réductase I et Réductase II).

I.1.2.4.3. Les solutions : Alcool, éthanol, liquide de Lugol, eau oxygénée, eau distillée, eau physiologique, lait écrémé.

I.2. Méthodes

I.2.1. Isolement et identification des bactéries lactiques

I.2.1.1. Echantillonnages

On a effectué des prélèvements sur trois échantillons:

- **Echantillon 1:** Djben.
- **Echantillon 2:** Bouhezza.
- **Echantillon 3:** L'ben.

Provenance des échantillons testés dans cette étude provenaient de Chèvre localisés dans la région de khenchela entre le mois Avril et Mai. Après collecte des échantillons et pour éviter les contaminations des échantillons. Sont recueilli dans des flacons stériles de 250 ml, conservé et transportés, dans une glacière au laboratoire. Et ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analysée.

I.2.1.2. Préparation des dilutions

I.2.1.2.1. Préparation de la solution mère

On préparée 3 solutions mère à partir a 3 échantillons (Djben, Bouhezza, L'ben):

La solution mère a été préparée; en introduit 1g (du fromage frais (Djben), ou Bouhezza), et 1ml (du L'ben) dans un tube stérile qui contient 9ml d'eau physiologique; l'homogénéisation a été réalisée à l'aide du vortex.

Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond à la dilution 1/10 ou 10^{-1} (Lebres *et al.*, 2002).

I.2.1.2.2. Préparation des dilutions décimales

Un millilitre de la dilution mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et ainsi de suite jusqu'à 10^{-5} (Guiraud, 2003). Toutes les manipulations sont faites avec du matériel stérile à proximité du bec bunsen.

I.2.1.3. Isolement des bactéries lactiques

On transfert à l'aide d'une pipette stérile dans une boîte de Pétri, une prise d'essai de 1ml de l'échantillon à analyser ou ses dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-5}).

On coule la gélose MRS et M17 maintenue en surfusion à 30°C dans des boîtes de Pétri, pour obtenir une répartition homogène des colonies, on procède par remuage des boîtes sur une surface plane en veillant à inverser régulièrement le sens de rotation. On laisse la gélose se solidifier (Cheriguene *et al.*, 2007).

I.2.1.4. Isolement dans un milieu sélectif

Les boîtes de pétri coulées par la gélose MRS et M17, sont ensemencées en surface à 0.1 ml de la dilution effectuée.

Les cultures sont incubées pendant 72 heures à 30°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...) sont repiquées sur milieu MRS et M17, incubées à 30°C afin de s'assurer de la pureté des cultures (**Kacem & Karam, 2006; Cheriguene et al., 2007**).

I.2.1.5. Purification

Après l'incubation, une colonie est prélevée de la surface puis réensemencée dans un bouillon MRS et M 17 à 30°C pendant 24h.

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux MRS et M17 (par la méthode des stries), et l'incubation à 30°C (**Kacem & Karam, 2006**).

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (**Guiraud, 2003**). Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

Ainsi, les isolats supposés appartenir aux genres *Streptocoques lactiques* et *Lactobacillus* sont repiqués sur leurs milieux d'enrichissement, puis incubées à 30°C pendant 24 h. A partir des cultures sur bouillon et à l'aide d'une pipette stérile, on ensemence du lait écrémé (milieu pour l'enrichissement) stérile réparti en tubes.

Le lait écrémé inoculé par les cultures est incubé à 37°C pendant 18h, toutefois la coagulation du lait après incubation indique la présence des bactéries acidifiantes ce qui laisse supposer qu'il s'agit des souches lactiques. De ce fait elles seront conservées pour subir les différents tests d'identification.

Remarque

Tout au long des différentes étapes d'isolement et de purification, il est nécessaire de réaliser une coloration de Gram afin de vérifier l'absence des germes contaminants Gram négatif et les boîtes contaminées sont éliminées.

I.2.1.6. Conservation des souches

Les cultures pures sont conservées à 4°C à la Réfrigérateur.

I.2.2. Identification des souches

L'identification des isolats de bactéries lactiques au stade genre a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique, et biochimique et physiologique.

La première consiste à tester tous les isolats par la coloration de Gram et l'observation microscopique afin de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement. Quant à l'étude biochimique et physiologique, elle consiste à soumettre les isolats aux tests suivants: Recherche de la catalase et nitrate réductase et la mobilité, et production d'acétoïne, et la capacité de croissance à différentes températures (10, 30, 40, et 45°C), à différentes concentrations en NaCl (2.5%, 4% et 6.5%), la détermination du type fermentaire par la mise en évidence de la production de gaz (CO₂), et de production des acides à partir des hydrates de carbonnes.

I.2.2.1. Caractérisation phénotypique des souches

Lors de cette étude, nous avons identifié les souches isolées à partir du Djben et L'ben et Bouhezza, par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

I.2.2.1.1. L'aspect macroscopique

- Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur bouillon nutritif et milieu M17 solide, milieu MRS solide et liquide; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies, et le trouble dans le milieu liquide.
- L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies.

I.2.2.1.2. L'aspect microscopique

I.2.2.1.2.1. Etat frais

- Un tube contenant le milieu MRS liquide (10ml) est inoculé par une colonie isolée sur gélose MRS, on incube à 30°C pendant 24 heures, jusqu'à l'apparition d'un trouble microbien.
- Pour la mobilité et la forme une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope (**Attallah & Belyagoubi, 2003**).

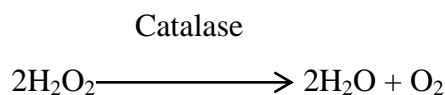
I.2.2.1.2.2. Coloration de Gram

- L'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries.
- La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (**Singleton, 1999**) (**Voir annexe N°3**). Cette coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (**Hadef, 2012**).

I.2.2.2. Identification biochimiques et physiologiques

I.2.2.2.1. Test de catalase

La recherche de la catalase se fait par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂). Le dégagement gazeux traduit l'activité positive de cette enzyme qui capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction:



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+) (**Marchal *et al.*, 1991**).

I.2.2.2.2. Test de Nitrate-réductase

Dans des tubes contenant chacun 5 ml de bouillon Nitrate sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 30°C pendant 24 h. Les réactifs des nitrites sont toujours présents donc on ajoute deux gouttes de réactif Réductase I et Réductase II dans Les tubes.

Deux cas sont possibles :

- Coloration rouge: La nitrate réductase est donc Positif.
- Pas de coloration rouge: La nitrate réductase est donc négatif.

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme: La nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

I.2.2.2.3. Test de Mannitol-mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 30°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (**Marchal *et al.*, 1991**).

I.2.2.2.4. Test de la production d'acétoïne

Chaque tube contenant 5 ml de bouillon Clark et lubs, préalablement inoculé avec des souches bactériennes et incubé à une température 30°C pendant 24h.

L'acétoïne est mise en évidence par la réaction de Voges proskauer (VP), en ajoutant 2 gouttes de réactif VP1 et le même volume de réactif VP2.

Les tubes sont inclinés pour permettre une bonne oxygénation. La réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu, après quelques minutes.

I.2.2.2.5. Production de CO₂ à partir du glucose

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂. Pour réaliser ce test, il suffit d'utiliser des tubes de milieu liquide glucosé dans lesquels on introduit préalablement des cloches de Durham qui permettent la mise en évidence du gaz produit (**Carbannelle et al., 1990**).

On ensemence le milieu de culture par les souches testées et on incube à 30°C (souche mésophile) et à 37°C (souches thermophiles), pendant 24 h. Pour les streptocoques et les lactobacilles, la réaction positive se traduit par la présence du gaz à 1/10 du volume de la cloche (**Leveau et al., 1991**).

I.2.2.2.6. Températures de croissance

Ce test est très important car, il permet de différencier les bactéries mésophiles de celles qui sont thermophiles. D'autre part, ce test permet aussi de distinguer entre les deux sous-genres homofermentaires du genre *Lactobacillus*: *Thermobacterium* et *Streptobacterium* (**Mitruka, 1976**).

Les tubes à essais contenant soit le M17 soit le MRS sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée, par les souches supposées appartenir aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*. L'incubation est réalisée à des températures et des durées différentes.

Les streptocoques	Les lactobacilles
10°C pendant 7 à 10 jours	15°C pendant 7 à 10 jours
30°C pendant 24 à 48 h	45°C pendant 24 à 48 h
40°C pendant 24 à 48 h	
45°C pendant 24 à 48 h	

La croissance bactérienne est estimée par l'apparition du trouble dans le bouillon (**Leveau et al., 1991; FIL-Norme, 1991**).

I.2.2.2.7. Test de croissance en milieux hostiles

- **Croissance sur bouillon hyper salé**

Ce test permet de voir l'aptitude des souches à se développer en présence de chlorure de sodium (NaCl). Il nous donne des renseignements précieux pour l'identification.

Cette aptitude est vérifiée par ensemencement du bouillon Elliker additionné respectivement de 2.5%, 4% et 6.5% de NaCl. L'incubation est réalisée à 30°C pour les souches mésophiles et à 37°C pour les souches thermophiles et ce pendant 48 heures. La présence d'un trouble indique la croissance bactérienne (**FIL-Norme, 1991**).

- **La thermorésistance**

Les Streptocoques sont testés sur bouillon M17 par chauffage du milieuensemencé au bain marie à une température de 63°C pendant 30 min.

Les tubes sont refroidis rapidement après chauffage, l'incubation est réalisée à 30°C (souches mésophiles) et à 37°C (souches thermophiles) pendant 24 à 48 h (**Guiraud & Galzey, 1980**).

I.2.2.2.8. Profil fermentaire des sucres

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés, en particulier des sucres (Arabinose, Amylose, fructose, Galactose, Glucose, Glycérol, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Mélibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Sorbitol, Tréhalose et Xylose) (**Larpent, 1993**). La faculté d'une bactérie à utiliser comme source d'énergie la dégradation d'un glucide s'accompagne généralement de la production d'acide qui conduit à l'abaissement du pH dans le milieu (**Leveau et al., 1991**).

La technique consiste à ensemencer les souches testées dans des tubes correspondants aux différents sucres et renferment comme indicateur de pH le rouge de phénol, par la suite on incube aux températures appropriées pendant 2 à 3 jours.

Le virage du milieu du rouge au jaune indique l'acidification du milieu donc dégradation du sucre (**Carbannelle et al., 1990**).

I.2.2.2.9. Profil fermentaire sur galeries API 20E

La galerie API 20E est constituée de 20 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les tests de fermentation sont inoculés avec API 20E qui réhydrate les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

Les bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives ont fait l'objet d'une analyse biochimique par le système API en utilisant la galerie API 20E. L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- Cultiver la souche pure sur milieu MRS et M 17 gélosé pendant 24h à 30°C.
- En introduit une colonie dans un tube stérile qui contient 9ml d'eau physiologique ; l'homogénéisation a été réalisée à l'aide du vortex, pour réaliser une suspension dense dans le tube.

- On transfère à l'aide d'une pipette stérile un certain nombre de gouttes de la première suspension, noter ce nombre de gouttes (n).
- Ouvrir une ampoule d'API 20E et inoculer avec deux fois le nombre de gouttes trouvées (2n), homogénéiser.
- Répartir API 20E ainsi inoculé dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber à 30°C en aérobiose pendant 24h.
- Tous les tests sont lus à 24h (on recherche dans chaque tubule l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du pourpre bromocrésol contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir).
- Enregistrer les résultats obtenus.
- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être comparé par le livre du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

Chapitre II :

Résultats et discussion



II.1. Isolement des bactéries lactiques

Nous avons réussi à isolé et purifié 06 souches de bactéries lactiques à partir des aliments laitiers traditionnels (L'ben, Bouhezza et Djben) appartenant au genre *Lactobacillus* et le genre *Lactococcus*.

II.1.1. L'aspect macroscopique

II.1.1.1. Sur milieu solide

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies isolées sur milieu solide MRS et M17, aussi de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (**Ana Belen Florez et al., 2006**).

Les cultures obtenues sur les boites de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2005**).

Pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide des:

- Colonies transparentes, rondes très petites (1mm).
- Colonies blanches, rondes ou lenticulaires est deux fois plus grande (2mm environ).
- Petites colonies blanches, rondes ou lenticulaires. (**Figure N°4 et N°5**)



Figure N°4: Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur le milieu M17.

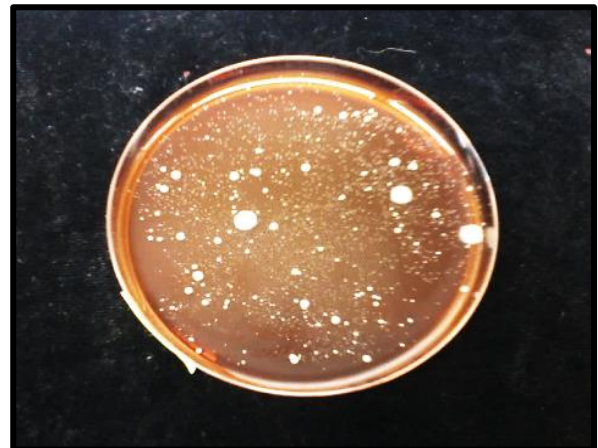


Figure N°5: Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur le milieu MRS.

➤ Purification

Après Le repiquage successifs par des stries d'épuisement sur gélose M17 et MRS, nous avons obtenu des souches pures à partir d'une seule colonie, pour l'objet d'une identification phénotypique.



Figure N°6: Colonies isolées après de repiquage sur gélose M17.

II.1.1.2. Sur milieu liquide

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène fumeux dans le milieu MRS liquide, ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries (Kihal, 1996; Carr *et al.*, 2002).

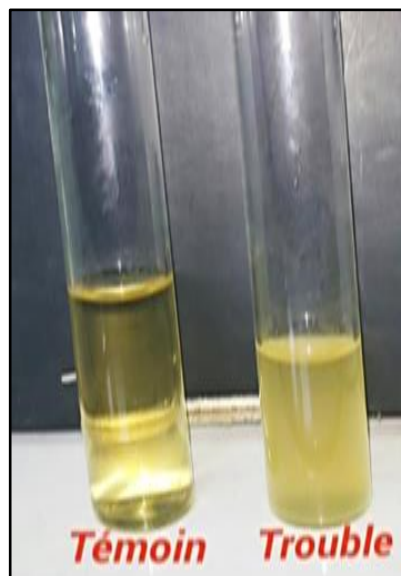


Figure N°7: Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide.

II.1.2. L'aspect microscopique

L'aspect microscopique des 6 souches après coloration de GRAM a révélé que :

- **Sur milieu MRS:** Les souches sont des bâtonnets GRAM positif, le mode d'association varie d'une souche à l'autre. Sachant que, ces bâtonnets présents des cellules isolées ou regroupées en paire ou en chaînette.
- **Sur milieu M17:** Les souches sont des coques GRAM positif, ces coques sont déposées en paires ou en chaînettes. (Tableau 9)

II.1.2.1. Etat frais

Les résultats d'observation microscopique d'examen directe à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur regroupement et surtout d'observer leur mobilité.

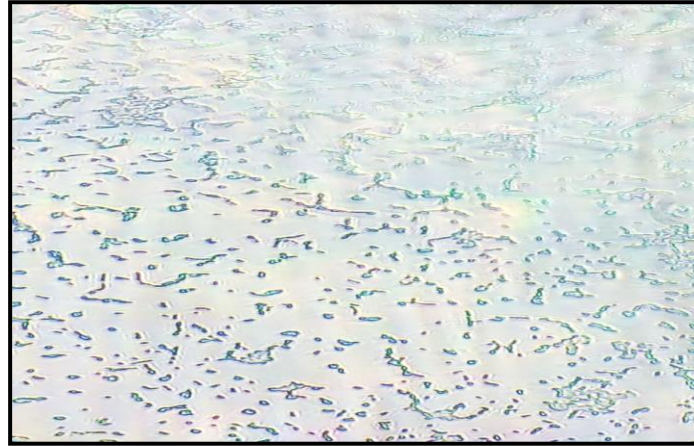


Figure N°8: Observation microscopique des bactéries lactiques à l'état frais avec un grossissement (G: 10x40).

II.1.2.2. Coloration de Gram

L'observation microscopique a révélé que les colonies isolés et purifiés sont Gram positif, apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations (**Joffin & Leyarl, 1996**).

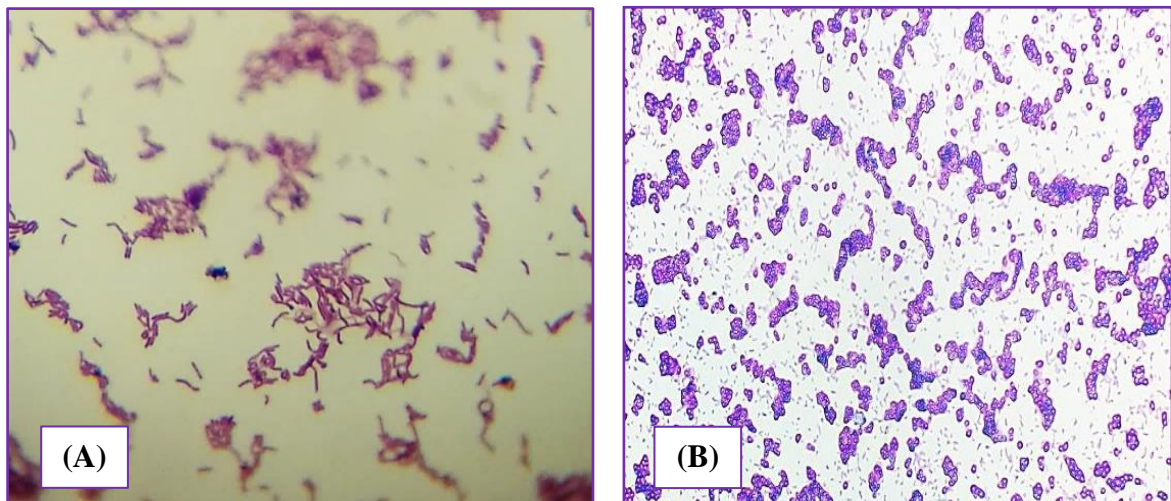


Figure N°9: Observation microscopique des bactéries lactiques après coloration de GRAM avec un grossissement (G: 10x100) ((A) : des bâtonnets, (B) : des coques).

Tableau N°9: Critères morphologiques et le test GRAM des isolats de chaque échantillon à partir de milieu MRS et M17

Echantillon	Souche	GRAM	Forme	Mode d'association
L'ben	Souche 1	+	Coques	Chainettes
	Souche 2	+	Coques	Chainettes / isolées
Bouhezza	Souche 3	+	Coques	Chainettes
Djben	Souche 4	+	Bâtonnets longs	Chainettes ou filamenteux
	Souche 5	+	Bâtonnets court	Chainettes
	Souche 6	+	Coques ovoïdes	Chainettes / paires

II.2. Tests biochimiques et physiologiques des isolats

En plus de ces tests de bases sur la morphologie des bactéries nous avons utilisé des tests physiologiques et biochimiques pour déterminer le genre de nos isolats.

II.2.1. Test de catalase

Les souches étudiées sont catalase négative. Car, on n'a pas obtenu des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, qui est conforme aux résultats trouvés par **Carr et al., (2002)**, ce qui nous orient à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques.

II.2.2. Test de Nitrate-réductase

- Pas de coloration rouge: La nitrate réductase est donc négatif.



Figure N°10: Teste Nitrate-réductase négative.

II.2.3. Test de Mannitol-mobilité

Les analyses ont montré que toutes les bactéries lactiques sont des bactéries immobiles. Car, Il n'y a pas d'une diffusion dans la gélose.

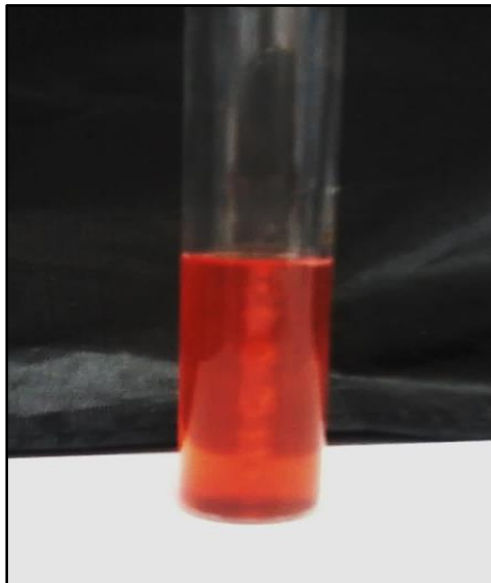


Figure N°11: Test Mannitol-mobilité.

Les résultats des tests biochimiques préliminaires sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°10: Caractères préliminaires des 06 souches isolées

Tests Souches	Catalase	Mobilité	Nitrate réductase
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-

- : Résultat négatif

II.2.4. Test de la production d'acétoïne

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. D'après la (**Figure N°12**), il apparaît Une anneau rouge indique une réaction VP positive, donc ils ont un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.



Figure N°12: Production d'acétoïne résultat positif (anneau rouge).

D'après les résultats obtenus la majorité des souches produisent de l'acétoïne en formant un anneau rouge sur le milieu Clark et Lubs.

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, *Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* et *Ln. mesenteroides ssp. cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers: Diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α -acétolactate (**Raynaud et al., 2003; Leroy & Devuyst, 2004**).

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers. Car, chez ces bactéries, le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO_2 , participant aux qualités aromatiques et texturales des produits (**Raynaud et al., 2003**).

II.2.5. Test de connaissance du type fermentaire

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaires. Alors que L'absence de dégagement de CO_2 dans la cloche de Durham indique que les souches sont homofermentaire qui fermente le sucre en lactate sans produire du gaz (**Sebastien, 2008**). Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicocoques, ainsi que certains lactobacilles (**Thompson et al., 1994**).

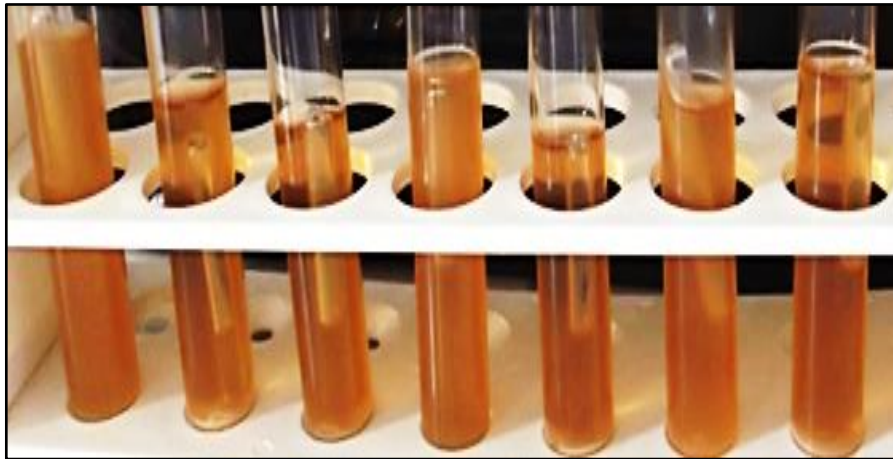


Figure N°13: Type fermentaire sur milieu liquide contenant la cloche de Durham.

Tableaux N°11: Résultats du test de type fermentaire

Souche	Type fermentaire
S 1	+
S 2	+
S 3	+
S 4	+
S 5	+
S 6	-

+: Homofermentaire, - : Hétérofermentaire.

II.2.6. Profil fermentaire sur galeries API 20E



Figure N°14: Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galeries API 20E.

Dans le **tableau 12**, on rapporte les profils de fermentation sur galeries API 20E des 6 souches isolées.

L'identification par galeries API 20E est faite en confirmant les profils obtenus avec les résultats des profils fermentaires classiques, et en comparant avec les données de la littérature.

Tableau N°12: Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galeries API 20E

Souches Tests	S1	S2	S3	S4	S5	S6
ONPG	-	-	-	+	+	-
ADH	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	+	-	+
ODC	-	-	-	+	-	+
CIT	-	-	-	-	-	+
H₂S	-	-	-	-	-	-
UREE	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-
INDOLE	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-
GLU	+	-	+	+	+	-
MAN	+	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-
RHA	+	-	-	-	-	+
SAC	-	-	+	+	+	-
MEL	-	-	-	+	+	-
AMY	-	-	-	-	+	-
ARA	-	-	-	+	+	-

+: Résultat positif, -: Résultat négatif

II.2.7. La fermentation des hydrates de carbonés

L'identification est complétée avec l'étude de la fermentation des hydrates de carbonés par les souches isolées.

L'identification des souches isolées est basée sur les profils des souches de référence selon les travaux de : **Leveau *et al.*, (1991)**; **Larpent J-P, (1996)**; **Bjokroht J., et Holzappfel W., (2006)** ; **Devoyod J.J., et Poullain F., (1988)**; **Teuber M., et Geis A., (2006)**; **Hammes W.P., et Hertel C., (2006)**.

Tableau N°13: Résultats du profil fermentaire des sucres

Sucres \ Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6
	Arabinose	-	-	-	+	+
Amylose	Nd	Nd	Nd	Nd	-	+
Fructose	±	±	-	+	+	-
Galactose	+	±	±	+	-	-
Glucose	-	+	+	-	+	Nd
Glycérol	Nd	Nd	Nd	+	Nd	+
Lactose	+	+	+	-	+	+
Maltose	-	-	+	-	-	+
Mannitol	-	+	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	-	-	-
Mélibiose	-	-	-	-	+	±
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	±	±	±	+	-	+
Ribose	-	-	-	-	-	+
Saccharose	-	-	+	-	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	±	Nd
Tréhalose	-	-	+	-	-	-
Xylose	+	+	-	+	-	-

+: Résultat positif, ±: Résultat variable, -: Résultat négatif, **Nd**: Résultat non définie.

Tableau N°14: Identification biochimique et physiologique des souches appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*

Espèces	<i>Lc. cremoris</i>		<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>		<i>Ln. mesenteroides</i> <i>subsp cremoris</i>
	LCC ₂ (S1)	LCC ₃ (S2)	LCL ₁ (S3)	LB ₁ (S4)	LB ₂ (S5)	LNC ₁ (S6)
Tests préliminaires:						
Gram	+	+	+	+	+	+
La catalase	-	-	-	-	-	-
La nitrate réductase	-	-	-	-	-	-
Le cytochrome oxydase	-	-	-	-	-	-
La mobilité	-	-	-	-	-	-
Morphologie	C	C	C	B	B	C
Tests physiologiques:						
La croissance à 10 °C	+	+	+	+	+	-
La croissance à 37 °C	+	+	+	+	+	+
La croissance à 40 °C	-	-	+	+	+	+
La croissance à 45 °C	-	-	-	-	-	+
La production de CO ₂	-	-	-	-	-	+
L'ADH	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	Nd	-	-
La production d'acétoïne	+	+	-	-	-	+
L'hydrolyse de la gélatine	-	-	-	-	-	-
La thermorésistance à 63°C pendant 30 mn	-	-	-	-	Nd	-
La croissance à 2 % de NaCl	+	+	+	+	+	+
La croissance à 4 % de NaCl	-	±	-	+	-	-
La croissance à 6.5 % de NaCl	-	±	-	-	-	-

+: Résultat positif, ±: Résultat variable, -: Résultat négatif, **Nd**: Résultat non définie, **C**:Cocci, **B**: Bacille.

II.3. Identification des souches

II.3.1. Espèces du genre *Lactococcus*

Les résultats préliminaires et des caractères biochimiques et physiologiques des Streptocoques lactiques sont regroupés dans le **tableau (14)**. Ces résultats montrent que les souches isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont: Gram⁺, immobiles, catalase (-), Cytochrome-Oxydase(-), Nitrate-réductase(-). Cependant, les tests spécifiques d'identification nous ont permis de regrouper les souches en espèces et sous espèces.

II.3.1.1. *Lactococcus lactis subsp.lactis*

Une (1) souche a été identifiée et attribué à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* par les propriétés suivantes: Elle est homofermentaires, cultive à 10°C mais pas à 45°C, possède une ADH, n'hydrolyse pas la gélatine, elle est capable de fermenter le mannose, le saccharose, le maltose, le tréhalose et le lactose mais incapable de fermenter, le fructose, le raffinose, l'arabinose, le mélibiose, le xylose, le sorbitol et le mannitol.

Comparant les différentes caractéristiques de la souche obtenue avec celles de l'espèce témoin, il ressort que la souche identifiée a répondu à toutes les caractéristiques de l'espèce de référence avec la présence de certaines différences à signaler par rapport l'espèce type: l'halotolérance à 6,5% de NaCl, leur capacité de fermenter le saccharose et/ou le xylose.

Pour le 1^{er} caractère, notre rapprochement est justifié si nous basons sur les données de **Deroissart (1994)** qui a suggère que certaines souches apparentées à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* peuvent croître en présence de 6,5% de NaCl, cependant **Leveau et al., (1989)** ont rapporté l'espèce en question ainsi que l'espèce *Lactococcus lactis subsp.cremoris* donnent une réponse variable selon les souches. Concernant la capacité de ces souches à métaboliser le saccharose, nos résultats ne se concordent pas avec les données de **Leveau et al., (1989)**; **Teuber (1992)** qui ont souligné que l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* est incapable de dégrader le saccharose. En revanche, seul **Larpent (1987)** en se basant sur le mode de transport du saccharose chez l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis*, a montré que le système inductible, et que le saccharose est transporté par un saccharose - PTP spécifiques, il a également noté que le système est inductible, et que la plupart des souches de *Lactococcus lactis subsp.lactis* sont incapables de métaboliser le saccharose. Enfin, le même auteur a suggéré un codage plasmidique de l'utilisation du saccharose et xylose.

II.3.1.2. *Lactococcus lactis subsp.cremoris*

Deux (2) souches: D'après les résultats obtenus des différents tests **tableau (14)**, effectués sur les souches isolées des Streptocoques lactiques nous avons pu identifier deux souches appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.cremoris*.

Ces souches sont homofermentaires, se cultivent à 10°C mais pas à 45°C, ne possèdent pas une ADH, non halotolérante à 6,5%, n'hydrolyse pas la gélatine.

Toutefois, leur profil de dégradation des glucides montre qu'elles ont le pouvoir de fermenter le mannose, le saccharose, le maltose, le xylose, le tréhalose et le lactose.

Comparant les différentes caractéristiques des souches obtenues avec celles de l'espèce type, il ressort que la majorité des souches identifiées a répondu à toutes les caractéristiques de l'espèce de référence avec la présence de certaines différences à signaler par rapport à l'espèce type. Ces différences portent sur: La croissance à 4% de NaCl et/ou la croissance à 40°C, le pouvoir fermentaire du glucose.

La croissance à 40°C se trouve difficile à expliquer dans toutes les clés d'identification établies par **Larpent (1987,1991)**; **Teuber (1992)**; **Leveau et al., (1989)**, **Deroissart (1994)**.

L'espèce *Lactococcus lactis subsp.cremoris* est incapable de se développer à 45°C. En ce qui concerne la capacité des souches à croître à 4% NaCl, notre rapprochement est justifié si nous référons à **Deroissart (1994)** qui a montré que *Lactococcus lactis subsp.cremoris* a une croissance à cette concentration en NaCl. Quant au pouvoir fermentaire du glucose, le résultat obtenu ne se concorde pas avec les données de **Larpent (1991)** et **Deroissart (1986)**, cette contradiction pourrait être justifiée par la perte de plasmide contrôlant la fermentation du glucose, ou pourrait être liée aux traitements de conservation qui peuvent engendrer des altérations au niveau de la membrane cytoplasmique des souches isolées et causent, de ce fait, une perturbation des activités métaboliques.

II.3.2. Espèces du genre *Leuconostoc*

II.3.2.1. *Leuconostoc méserteroides subsp.cremoris*

Une(1) souche isolée a été identifiée et rapprochée de l'espèce *Leuconostoc méserteroides subsp.cremoris* par les propriétés suivantes: Elle est hétérofermentaire, incapable de croître à 45°C, mais capable de le faire à 10°C, ne possède pas une ADH, non thermorésistante à 60°C pendant 30 mn, non halotolérante à 6,5% de NaCl.

Leur profil de dégradation des glucides montre qu'elles ont le pouvoir de fermenter le glucose, le maltose, le lactose, le rhamnose, le ribose et le sorbitol. Par contre ces souches sont incapables de dégrader l'arabinose, le fructose, le mannitol, le raffinose, le saccharose et le tréhalose.

Comparant les résultats obtenus dans le **tableau (14)** avec ceux de l'espèce de référence cité par **Larpent (1991)**, **Deroissart (1994)**, il ressort que ces souches répondent à toutes les caractéristiques de l'espèce témoin avec la présence de différences vis-à-vis la fermentation du maltose et du mannose.

Concernant la capacité de ces souches à métaboliser le maltose, nos résultats pourraient être justifiés par les données de **Larpent (1991)**, **Dicks et al., (1993)** qui ont cité la variabilité de ces souches vis-à-vis la fermentation du maltose. Quant à la variabilité de ces souches à dégrader le mélibiose, **Deroissart (1994)**, **Larpent (1991)**, **Dicks et al., (1993)** ont souligné que l'espèce *Leuconostoc mésenteroides subsp. cremoris* donne un résultat négatif en vers la fermentation de sucre en question.

II.3.3. Espèces du genre *Lactobacillus*

II.3.3.1. *Lactobacillus plantarum*

Les isolats de *Lactobacillus* ont été représentés par deux espèces. Normalement, ils ont été différenciés par le type de fermentation des carbohydrates. Mais le profil de la fermentation des sucres de ces isolats a été comparés avec celles de souches de référence de la clef d'identification établi par **Larpent (1993)**. Cependant, les résultats des tests préliminaires des lactobacilles sont regroupés dans le **tableau (14)**. Ces résultats montrent clairement que nos souches isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont Gram⁺, immobiles, asporulées, catalase(-), Cytochrome-Oxydase(-), Nitrate –réductase(-).

Deux (2) souches isolées ont été rapprochées de l'espèce de *Lactobacillus plantarum* par les caractéristiques suivantes: Elles sont homofermentaires, se cultivent à 10°C mais pas à 45°C, ne possèdent pas une ADH, fermentent le glucose, le saccharose, le raffinose, le galactose, le fructose, le tréhalose et le sorbitol. Par contre les trois souches appartenant à cette espèce se différencient de l'espèce type par les caractères dits « variables », il s'agit par exemple de la capacité des souches à fermenter l'arabinose et le xylose les souches étudiées ont données des réactions positives avec les deux sucres cité précédemment.

A ce propos, **Teuber (1992)** a montré qu'entre 61.89% des souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* sont capable de fermenter les deux sucres en question.

Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques occupent une place très importante dans notre vie douées de plusieurs activités, elles sont considérées comme additif alimentaires ou elles sont trouvées naturellement dans le produit. Un intérêt industriel tout particulier a été porté pour les bactéries lactiques, avec les nouvelles techniques de conservation des produits alimentaires, elles sont utilisées aussi pour améliorer des caractères organoleptiques de produit (le gout, la saveur, la texture, l'arôme de produits par exemple le lait fermenté, le yaourt, le fromage, le pain et les produits carnée...etc.). Pour ces raisons industriellement les bactéries lactiques sont commercialisées pour l'utilisation en fermentation et préservation des produits alimentaires.

Dans notre travail, nous avons d'abord isolé des bactéries lactiques à partir de Djben (fromage traditionnel), Bouhezza, L'ben, de la région de kenchela. Ces bactéries une fois isolées ont fait l'objet d'étude approfondi pour bien les identifier et les caractériser.

Les tests d'identifications aux quels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 06 souches lactiques appartenant aux genres de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, et *Leuconostoc*.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que la présence de divers genres de bactéries lactiques dans le Djben et Bouhezza et L'ben était prévisible. Car, les bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de tous les échantillons étudiés.

Les résultats de notre étude indiquent des particularités de la flore lactique du Djben et Bouhezza et L'ben. C'est d'abord la présence de *Leuconostoc mésenteroides subsp.cremoris* comme seule espèce de *Leuconostoc* trouvée dans l'échantillon de Djben.

L'identification des différentes souches a montré une répartition très variée des espèces dans les trois échantillons appartenant au lait de chèvre. Trois genres ont été identifiés avec une dominance de *Lactococcus* suivie de *Lactobacillus*, et *Leuconostoc*.

A partir de cette étude on a pu conclure que :

Ces observations ouvrent des Perspectives futures:

- D'augmenter le nombre des souches isolées.
- D'utiliser des techniques moléculaires pour la confirmation de l'identification de ces bactéries isolées.
- D'élargir Les compétences acquises dans ce domaine sur dérivés lait traditionnels consommés.

Références bibliographiques



-A-

- **Abdelaziz S., et Ait Kaci F., (1992).** Contribution à l'étude physico-chimique et microbiologique d'un fromage traditionnel algérien fabriqué à partir du lait de chèvre le "Djben". Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Institut national agronomique d'El Harrach, Alger. 67 p.
- **Aissaoui Zitoun O., (2003).** Fabrication et caractéristique d'un fromage traditionnel Algérien Bouhezza. Thèse de magister INATAA, Constantine. Algérie, 138p.
- **Aissaoui Zitoun O., Zidoune M.N., (2006).** Le fromage traditionnel algérien "Bouhezza". Séminaire d'Animation Régional. "Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments -INSAT-".Tunis (communication orale), Tunisie/ 27 –28 –29 novembre Actes des sommaires. Pp 118 à 124.
- **Alais C., et Linden G., (1987).** Biochimie alimentaire, Ed., Masson et Cie, 224p. Paris.
- **Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., et Helander I.M., (2000).** Lactic acid permeabilizes gram-negatif bacteria by disrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* 66(5): 2001-2005.
- **Ana Belen F., Lopez-Diaz-Martin P., et Mayo B., (2006).** Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pâte persillée fromage de Cabrales : Identification des dominantes des bactéries lactiques. *Eur. Res. Technol. Aliment.* 223, 503-508.
- **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., et Simpson R., (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyses du lait IN science et technologies du lait transformation du lait par Vignola Carole L.presse internationale polytechnique, 1- 60.
- **Ammor S., Rachman C., Chaillou S., Prevost H., Dousset X., Zagorec M., Dufour E., Isabelle Chevallier I., (2005).** Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food microbiology*, 22: 373-382.
- **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.

- **Attallah A., Belyagoubi L., (2003).** Isolement et caractérisation des souches de *Listeria* dans le lait cru provenant de différentes régions de l'Ouest Algérien au niveau de la réception de G. P.I. Lait de Tlemcen. Mémoire d'ingénieur, Institut de Biologie, Université de Tlemcen. 63 pages.
- **Axelsson L., (1993).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York. Bacteriology, Vol.2. (P. H .A. Sneath. N. S. Mair., M. E. Shar & K. G. Holt, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1075-1079.
- **Axelsson L., (1998).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Decker. p. 1-72.

-B-

- **Badis A., Guetarnib D., Moussa Boudjemaa B., Hennic D.E., Kihal M., (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21:579–588.
- **Badis A., Guetarni D., Kihal M., et Ouzrout R., (2005).** Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle". *Scien & Tech*, 23: 30-37.
- **Beal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F., et Obert J. P., (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. dans Corrieu, G. et Luquet, F. M Ed. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 661-785.
- **Bendanou., (1981).** L'industrie beurrière chez les pasteurs nomades du sud-Algérien. Communication faite à l'Office Colonial de l'Algérie, 570-580.
- **Bergy's manual., (2009).** Systematic of bacteriology. 2nd Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer.
- **Berthier F., et Ehrlich S.D., (1998).** Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the16S/23S RNAr spacer region. *FEMS. Microbial. Lett.* 161: 97-106.
- **Björkroth J., et Holzappel W., (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (3rd edition). Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

-C-

- **Carbonnelle B., Denis F., Mannonier A., Binon G et Vargiver K., (1990).** Bactériologie médicale. Techniques visuelles, pp.23.
- **Carole L., et Vignola C.L., (2002).** Science et technologie du lait. Presses inter Polytechnique, 600 p.
- **Carr F.J., Chill D., et Maida N., (2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol*, 28 : (4) 281-370.
- **Casalta E., (2003).** Maîtrise de la qualité du Venaco, un fromage au lait cru. Bases scientifiques pour la mise au point de ferments sélectionnés. Thèse de doctorat de l'université de Dijon, France.106 p.
- **Champnier-Verges M.C., Chaillou S., Cornet M., et Zagorec M., (2002).** Erratum to *Lactobacillus sakei*: recent and future prospects *R. Microbiol.*153: 115-123.
- **Cheriguene A., Chougrani F., Bekada A., El Soda M., and Bensoltane A., (2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. In *African. Journal of Biotechnology*, 6 (15): 1854-1861.
- **Chye F.Y., Abdullah A., et Ayob M.K., (2004).** Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol*, 21: 535–541.
- **Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., and Kandler O., (1987).** *Streptococcus garviae* sp. Nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. *Journal of General Microbiology*, 129, pp: 3427-3431. Constantine, Algérie, 83p.
- **Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., et Wall banks S., (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75): 595-603.
- **Curk M.C., Peladan F., Hubert J.C., (1993).** Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*, 73:215-231.

-D-

- **De Roissart H., et Luquet F.M., (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.
- **Debry G., (2001).** Lait, nutrition et santé, Technique et documentation. Lavoisier, 335p.

- **Debry G., (2006).** Lait, nutrition et santé. Edition Technique et Documentation, Lavoisier. Paris.
- **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M., et Janssens C., (1994).** Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : 25-114.
- **Deroissart H.B., (1986).** Les bactéries laciqueus : Lait et produits laitieres vaches, berbis, chèvres. Vol : III. Ed : APRIA.
- **Deroissart H.B., (1994).** Les bactéries lactiques. In-Laits et produits laitiers, Vol.3. (F. M. Luquet, éd.). Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp. 343-407.
- **Desmazeaud M., (1992).** Les bactéries lactiques. In-Les groupes microbiens d'intérêt laitier (Hermier, J., Lenoir, J & Weber, F, eds.). C.E.P.I.L. Technique & Documentation. Lavoisier.pp.9-60.
- **Dharam P., Narender R.P., (2007).** Indian traditional dairy products: an overview. International Conference on Traditional Dairy Foods. November 14-17.
- **Dillon J.C., (2008).** Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech).
- **Dicks JTA., Montgomery I., Elwood RW., (1993).** Replacement of the indigenous amphipod *Gammarus duebeni celticus* by the introduced *G. pulex*: differential cannibalism and mutual predation. *Journal of Animal Ecology* 62: 79–88,
- **Doleyres Y., Paquin C., Leroy M. et Lacroix C., (2002).** *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *App. Microbiol. Biotechnol.* 60 : 168-173.
- **Dortu C., et Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13:143-154.
- **Drouault S., et Corthier G., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés.
- **Dutka-Malen S., Evers S., et Courvalin P., (1995).** Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24-27.
- **Dykes G. A., et Von Holy A., (1994).** Strain typing in the genus *Lactobacillus* .*Lett. Appl. Microbiol.* , 19:63-66.

- **Dykes G.A., Cloete T.E., et Von Holy A., (1995).** Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-pachaged processed meatspoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 89-100.

-E-

- **El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El-Mecherfi K.E., Bazukyan I., Chois I., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y. G., Kuliev A.A., Mozzi F., Chobert J.M., Haertlé T., (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.*, 22: 509-516.

-F-

- **Farrow J.A.E., Facklam R.C., And Collins M.D., (1984).** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, pp: 279-283.
- **FIL-Norme., (1991).** Yaourt, identification des micro-organismes caractéristiques: *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Sterptococcus. salivarius subsp thermophilus*. *Revue* .46:1-4.
- **Fox G.E., Wisotzkey J.D., et Jurtshuk Jr. P., (1992).** How close is close: 16S RNAr sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacterial.* 42:166-170.
- **Frank J. F., et Hassan A. N., (1998).** Starters cultures and their use. In *Applied Dairy Microbiology*. Marth, E. H. ET Steele, J. L. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp.131-172.
- **Francois Z.N., Nour El houda, Florance, F.A., Paul M.F., Félicite T.M and EL soda M., (2007).** Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starter's cultures. *Biotechnology*. 6(1):1421.

-G-

- **Galvez A., Abriouel H., Ben Omar N., & Lucas R., (2011).** Food Applications and Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.

- **Gancheva A., Pot B., Vanhonacker K., Hoste B., Kersters K., (1999).** A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. Syst. Appl. Microbiol., 22:573-585.
- **Garrity G., Boone D., Castenholz W., (1984).** The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Originally published by Williams and Wilkins. 2nd Ed. Hardcover: 721p.
- **Garrity G., Brenner D., Krieg N., et Staley J., (2008).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes. Originally published by Williams and Wilkins, 1984, 2nd Ed. Hardcover. Vol: 3: 1450 p.
- **Gatti., Fornasari., Neviana., (2001).** Differentiation of *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus delbruekii subsp. lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. Lett. Appl. Microbiol. 32: 352-356.
- **Georgalaki M.D., Papadelli M., Anastasiou R., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., (2002).** Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene. Le Lait, 82, 657–671.
- **Gevers D., (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. These Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- **Gilarova R., Voldrich M., Demnerova K., Cerovsky M., et Dobias J., (1994).** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 24: 315-319.
- **Gonzalez C., Langdon G.M., Bruix M., Galvez A., Valdivia E., Maqueda M., Rico M., (2000).** Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 97: 11221-11226.
- **Guiraud J.P., et Galzy P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Ed. Lavoisier, 119 p. Paris.
- **Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- **Guiraud J.P., (2003).** Pratique des normes en microbiologie Alimentaire, 50p.
- **Guiraud J.P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Tech et doc la voisier. 136- 137pp. Paris.

-H-

- **Hadef., (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des lactiques locales. Mémoire de magister: pp 7-8.
- **Hammes W. P., & Hertel C., (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. (Eds). The prokaryotes, Vol. (4). Springer Science and Business Media. New York, USA. PP : 320-403.
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., et Bouhadi D., (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. PP: 37-55.
- **Hebboul F.Z., Mazouzi H., Soltani S., (2005).** Etude comparative de la qualité alimentaire entre trois types de lait frais : Bovin, caprin, camelin. Mémoire d'ingénieur, Département de Biologie, Université de Laghouat. 71 pages.
- **Hellal., (2001).** Fromages traditionnels Algériens. Quel avenir ? Revue Agro-Ligne n° 14, pp : 45-47.
- **Hemme D., Foucaud-Scheunemann C., (2004).** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal 14, 467-494.
- **Ho TNT., Tuan N., Deschamps A et Caubet R., (2007).** Isolation and identification lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology: pp 134-142. Hogg T., 2005. Essential microbiology. John Wiley and Sons. Ltd: pp188-190.
- **Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. & Schillinger U., (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73(suppl): 365S–73S.

-J-

- **Jeantet., Croguenne T., Machaut M., Schuck P., Brule G., (2008).** Les produits laitiers. Ed. TEC et DOC, 122p.
- **Jensen R.J., et Newberg D.V., (1995).** Milk lipids: B: Bovine milk lipids. In Handbook of milk composition (Ed. JENSEN R. J.), Academic press, pp 543-575, 920p.

-K-

- **Kaan-Tekinsen, Elmali, Ulukanliz. (2007).** Microbiological quality of UHT milk consumed in Turkey. Journal of food safety. Vol 7 p45-48.
- **Kacem M., et Karam N., (2006).** Physicochemical and microbiological study of «Smen», a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast.
- **Karrouche M., (1994).** Effet périodique de la traite sur la composition du lait. Mémoire d'ingénieur. 68p.Batna
- **Ke D., Picard F.J., Martineau F., Menard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G., (1999).** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J. Clin. Microbiol. 37: 3497-3503.
- **Kerstens K., (1985).** Numerical method in the classification of bacteria by protein electrophoresis. Academic Press.
- **Kihal M., (1996).** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.
- **König H., et Fröhlich J., (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C. et Divya., (2009).** Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis subsp. lactis* MTCC3038. Int. J. Prob. Preb. 4(3) : 1-6
- **Krieg N R., (2001).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Vol: 1.

-L-

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., et Ouhssine M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. pp: 237-250.
- **Laease., (2005).** In Boudjani W., (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. p : 73.
- **Lahtinen S., Ouwhand AC., Seppo S., Von Wright A., (2012).** Lactic Acid Bacteria microbiological and functional aspects, Fourth edition. Taylor et Francis group, 13: 978-1-4398-3678-1.UK.

- **Lancefield R.C., (1933).** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57, 571.
- **Larpent J.P., (1987).** Micro-organismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages: leur rôle sur les propriétés organoleptiques. In- *Biotechnologie et industries laitières.*
- **Larpent J.P., (1991).** Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires: (produits laitiers et carnés). *Technique & documentation, Lavoisier, Paris, 241p.*
- **Larpent J.P., (1997).** Mémento technique de microbiologie .3^{ème} Ed. *Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages.*
- **Laurent S., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris. 307 pages.*
- **Lebres A. D., et Hamza A., (2002).** Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des laits et produits laitiers», Institut Pasteur d'Algérie.
- **Leisner J.J., Vancanneyt M., Goris G., Christensen Het Rusul, G., (2000).** Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen .Nov, sp. Nov. a new lactic acid bacterium isolated from chillibo. A Malisian food ingredient. *Int. J. Sys Evol. Microbiol.* 50: 19-24.
- **Lemouchi., (2008).** Le fromage traditionnel Bouhezza: enquête dans la wilaya de Tébessa et suivie de l'évolution des caractéristiques physico-chimique de deux fabrication .mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, 65p.
- **Leroy F. and De Vuyst L. (2004).** Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry, *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67–78.
- **Leveau J.Y., et Bouix M., (1989).** La flore lactique .In- Guide pratique d'analyse micro biologique des laits et produits laitiers. (Beerens, H & Luquet, F. M, édi.). *Tech Documentation, Lavoisier, 250p*
- **Leveau J.Y., et Bouix M., (1991).** Les levures. Dans : *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel.* Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.
- **Leyral G., Vierling E., (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments. 3^{ème} édition *Doin. France. P. 87-114.*
- **Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I. et Talon R., (2007).** Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* 25(5) : 172.

- **Lhsaoui S., (2009).** Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur Université El Hadj Lakhdar Batna, Département d'Agronomie.
- **Luquet F.M., (1985).** Lait et produits laitiers, vache-brebis-chèvre. Ed., Tec &Doc, Lavoisier. 633 p. Paris.
- **Luquet F.M., (1990).** Les industries Agroalimentaires Ed. Technique et documentation, Lavoisier, paris, 637 p.
- **Luquet F.M., et Corrieu G., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.
- **Luquet F.M., Corrieu G., (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France. P 472 -676.

-M-

- **Mahaut M., Jeantet R., Blule G., Schuck P., (2005).** Les produits industriels laitiers Tec et Doc Lavoisier. Paris. 110p.
- **Marchal N., Bourdon J.L., et Richard CL., (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Marth E. H., et Steele J.L., (2001).** Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.
- **Mathieu J., (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 110 P.
- **Mäyrä-Mäkinen A., et Bigret., (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. ET Von Wright, A. (Ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.73-102.
- **Mekentichi Z., (2003).** Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (Bouhezza). Mémoire d'ingénieur. Dept Agronomie. Université de Batna. Algérie.
- **Mennane Z., Khedid K., Zinedine A., Lagzouli M., Ouhssine M., Monnet V., Latrille E., Beal C., et Corrieu G., (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.

- **Montel M. C., Talon R., Fournaud J et Champomier M.C., (1991).** A simplified key of identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium spp.* From meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 469-472.
- **Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., et Copola S., (2000).** Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesneteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 422-424.
- **Muto A., et Osawa S., (1987).** The guanine and cytosine content of genomic DAN and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:166-169.

-N-

- **Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M., et Dadie A., (2009).** Characterization of the purified coaguland extracts derived from artichoke flowers (*Cynarascolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *International Journal of Food Technology* 7:20-2.

-O-

- **Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C., et Saihi A., (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc genus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286-290.
- **Ogunbanwo S.T., Sanni A.L., Omilude A., (2003).** Characterization of lactobacilli in cheese. *Journal of dairy research*, 25, 431-438.
- **Orla-Jensen S., (1919).** The lactic acid bacteria. Host and Son, Copenhagen.
- **Ouwehand A., (1998).** Antimicrobial components from lactic bacteria. In: Salminen S, von Wright A, editor S. Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker Inc. p 139-60.
- **Oyewole O.B., (1997).** Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control*, 8: 289-297.

-P-

- **Pilet M.F., Magras C., Federighi M., (2005).** Bactéries lactiques. In: Bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2^{ème} Ed., Economica. Paris. 219-240.
- **Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F., et Kersters K., (1996).** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19 : 213-222.

- **Pot B., (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.
- **Prescott L.M., Harley J.P., et Donald A., (2003).** Microbiologie, De boeck université, 2^{ème} édition française. 128, pp.28-29. Singleton, P. (1999).Bactériologie.4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
- **Prescott., Harley., Klein., (2003).** Microbiologie .2^{ème} Edition française. De baeock et lacier S.A., 1137p.
- **Pringsulaka O., Thonggam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K., Rangsiruji A., (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food Control, 23:547-551.
- **Priyanka S., et Prakash A., (2009).** Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. Internet Journal of Food Safety, 11:81-87.

-R-

- **Rachman C.N., Kabadjova R., Valcheva R., Prevost H., et Dousset X., (2004).** Identification of *Carnobacterium* specie by Restriction Length Polymorphism of the 16S- 23S DNAr intergenic Spacer and Species-specific PCR. Appl Environ Microbiol. 70: 4468- 4477.
- **Rahali V., et Menard J.L., (1991).** Influence des variantes génétiques de la β -lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. Lait, 71: 275–297.
- **Raynaud S., Perrin R., Coccain-Bousquet M. et Loubière P., (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. App. Env. Microbiol. 71(12) : 8016- 8023.
- **Rementzis J., et Samelis J., (1996).** Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* strains of meat origin. Lett. Appl. Microbiol. 23: 379-384.
- **Rochat T., Gratadoux J.J., Gruss A., Corthier G., Maguin E., Langella P., Van De Guchte M., (2006).** Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection

of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. Applied and Environmental Microbiology 72, 5143-5149.

- **Rodriguez J.M., Martinez M.I., Horn N., et Dodd H.M., (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80: 101-116.
- **Rossello-Mora R., et Amann R., (2001).** The Species Concept for Prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 25:39-67.

-S-

- **Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A., (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Satura et Federighi., (1998).** In Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés.
- **Schleifer K. H., et Stachebrandt, E., (1983).** Molecular systematics of prokaryotes. Annul. Rev. Microbiol. 37:143-187.
- **Schleifer K.H., et Kilpper-Balz R., (1987).** Molecular and chromo taxonomic approaches to the classification of *Sreptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. Rev. Sys. Appl. Microbiol., 10: 1-19.
- **Shan-Na L., Han Y., Zhi-Jiang Z., (2011).** Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. Food Research International, 44: 643–651.
- **Siegumfeldt H., Rechinger Kb., Jakobsen M., (2000).** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl Environ Microbiol, 66: 2330-2335.
- **Singleton, P. (1999).** Bactériologie. 4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
- **Stackebrandt E., Goebel B.M., (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 116S RNAr sequence analysis in the present specie definition in bacteriology. Int. J. Sys. Bacteriol. 44: 846-849.
- **Stiles M.E., et Holzapfel W.H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current. Taxonomy. International. Journal of Food. Microbiology: 36: pp1-29
- **Streit F., Corrieu G., et Beal C., (2007).** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* CF11. J. Biotechnol. 128: 659-667.

-T-

- **Tamime A.Y., (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3^{ème} Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- **Temmar N., (2007).** Journal El-Watan.
- **Temmerman R., Huys G., et Swings J., (2004).** Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. Trends Food Sci. Tech. 15: 348–359.
- **Teuber M., (1992).** Lactic acid bacteria. Eds. Anonyme, Munich, Swidserl and. pp. 325-344.
- **Thompson J., Gentry-Weeks C.R., (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet).
- **Torriani S., Clementi F., Vancanneyt M., Hoste B., Dellaglio F., and Kersters K., (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *Lc. pentosus* and *Lc. paraplantarum* species by RAPDPCR and AFLP. Syst. Appl. Microbiol. 24:554-560.
- **Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D., et Sonomoto K., (2005).** Reconstitution and function of *Tetragenococcus* halophile chaperonin 60 tetradecamer. J. Biosci. Bioengin. 99: 30-37.
- **Touati K., (1990).** Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, 83 p.

-V-

- **Valerie C., Segolene D., Marion B., Micheline G., et Jeau Paul N., (2008).** Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products, lait 83, Review article, DOI:10.1051.lait : 2003019.269.
- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Keresters K., et Swings J., (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol. Rev. 60: 407p.
- **Veisseyre., (1979).** Technologie de fromage.3^{ème} édition. la maison rustique.714p.
- **Vierling E., (1999).** Aliment et boissons. Filière et produits. Doin édition. 270p.
- **Vierling E., (2003).** Aliment et boisson. Filière et produits. Doin éditions, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.270p.

- **Vignola C.L., (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Edition Presses internationales polytechniques. Montréal, 602 P.
- **Vilain A.C., (2010).** Qu'est-ce que le lait ?, Revue française d'allergologie, 50: 124-127.
- **Vimahieu., (2005).** Composition du lait .Edition Université libre de Bruxelles.

-Y-

- **Yateem A., Balba M.T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., Al-Daher R., (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. Int. J. Dairy Sci., 3:194-199.

-Z-

- **Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M., et Goodfellow M., (1988).** DNA bas composition and homology value in the classification of some *Rhodococcus* species. J. Gen. Microbiol. 134:3807-3813.
- **Zalacain I., Zapelena M.J., Astiasaran I., Bello J., (1996).** Addition of lipase from *candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. Meat science, 42: 155-163.

Annexes



Annexes

Annexe N°1: Composition des diluants (g/l)

- **Eau physiologie 9 /ml**

NaCl.....	9g
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe N°2: Composition des milieux de cultures (g/l) (Guiraud, 1998)

- **Milieux solides**

- **Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium.....	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05g
Agar	12g
Tween80	1ml
Eau distillée q.s.p	1000ml
Extrait de levure	5g
Extrait de viande.....	5g
Peptone	10g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium.....	2g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05g
Agar	12g
Tween80	1 ml
Eau distillée q.s.p	1000 ml
pH=6.5±0.2 à 37°C	
Autoclavage : 121°C /15min.	

- **Milieu M 17**

Extrait de levure	2, 5g
Extrait de viande	5g
Peptone de caséine	2, 5g
Peptone de viande	2, 5g
Peptone de soja	5g

Peptone de soja 5g
 Acide ascorbique 0,5g
 B-glycérophosphate de sodium 19g
 Agar 12,75g
 Sulfate de magnésium 0.25g
 Eau distillée q.s.p 1000 ml
 pH=7.1±0.2 à 37 °C
 Autoclavage : 121°C pendant 15min.

- **Milieu mannitol mobilité**

Peptone 20g
 Rouge de phénol à 1 % 4 ml
 Nitrate de potassium (KNO₃) 1g
 Gélose 4g
 Mannitol 2 g
 Agar 4 g
 Eau distillée q.s.p 1000 ml
 pH=7.6-7.8
 Autoclavage : 121°C pendant 15min.

- **MRS -Bouillon**

Peptone 10g
 Extrait de viande 8g
 Extrait de levure 4g
 Glucose 20g
 Acétate de sodium trihydraté 5,0g
 Citrate d'ammonium 2,0g
 Tween 80 1,0 ml
 Hydrogénophosphate de potassium 2,0g
 Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2g
 Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g
 pH = 6.2 à 37°C
 Autoclavage : 121°C pendant 15min.

- **Milieus liquides**

- **Bouillon nutritif**

Peptone 10 g
 Sulfate de manganèse 0,04 g
 Extrait de viande 5 g
 Eau distillée q.s.p 1000 ml
 pH = 7,2 à 37°C
 Autoclavage : 121°C pendant 15min.

- **Clark et Lubs**

Peptone tryptique ou poly peptone	5-7g
Glucose	5 g
Phosphate dipotassique	5 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml
pH =7	

Annexe N°3: Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres. (Singleton, 1999)

Annexe N°4: Composition des colorants

- **Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane	10g (ou 5g)
Phénol.....	20g
Ethanol à 0.95.....	100 cm ³
Eau distillée.....	1 dm ³

- **Lugol**

Iode	5g
IO dure de potassium	10g
Eau distillée qsp.....	1g

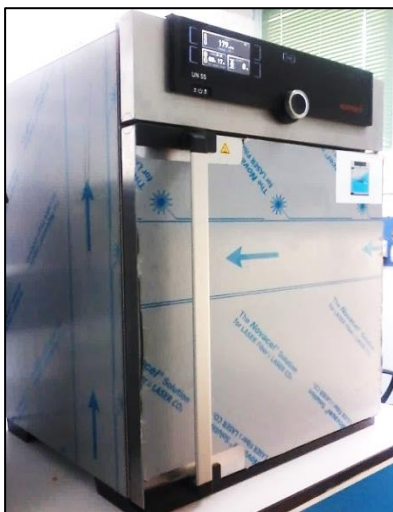
- **Fuchsine de Ziehl Fuchsine**

Bosique	10g
Phénol.....	50g
Ethanol à 0.5.....	10cm ³
Eau distillée	1dm ³

Annexe N°5: Liste de matériels utilisés



Vortex



Incubateur



Réfrigérateur



Autoclave



Microscope Optique



Plaque chauffantes



Balance



Etuve



Bain marie



Hot

Annexe N°6: Tableau de lecture des résultats de la galerie 20 E

Tests	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine decarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine decarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle /jaune	Bleu-vert/bleu
H2S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noir
URE	Urease	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane deaminase	TDA/immédiat Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production	JAMES/immédiat Incolore Vert-pale/Jaune	Rose
VP	Acetion production	VP1+VP2/10min Incolore	Rose/rouge
GEL	Gelatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose fermentation/oxidation	Bleu/Bleu-vert	Jaune/Jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxidation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol fermentation/oxidation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxidation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxidation		
SAC	Sucrose fermentation/oxidation		
MEL	Melibiose fermentation/oxidation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxidation		

**Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir
des produits laitiers traditionnels**

Résumé

Notre travail nous a permis d'étudier la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques de trois souches du Djben et Bouhezza, et L'ben préparé à partir du lait de chèvre de la région de kenchela. Cette identification phénotypique a été réalisée au niveau du laboratoire de faculté de science de la nature et de la vie (**Université Abbès Laghrour –Khenchela-**).

Ces six souches des bactéries lactiques ont été isolées sur les milieux M17 et MRS aux temps et température d'incubation équants. Les tests morphologiques et chimiques et physiologiques, et système AIP 20E ont permis d'identifier trois souches de *Lactococcus* (une souche de *Lactococcus lactis subsp.lactis*, et deux souches de *Lactococcus lactis subsp.cremoris*), deux souches de *Lactobacillus* (*Lb. Plantarum*), et une souche *Leuconostoc* (*Leuconostoc méserteroides subsp.cremoris*), avec la dominance du genre *streptocoque lactique*.

Mots clés: Caractères phénotypiques, Bactéries lactiques, Djben, Bouhezza, L'ben, Lait de chèvre.

**Phenotypic characterization of lactic bacteria isolated
from traditional dairy foods**

Abstract

Our work has allowed us to study the phenotypic characterization of lactic bacteria of 3 samples: Jben, Bouhezza, and Lben prepared from goat milk in the region of Khenchela. This identification phenotypic make in the laboratory Science Faculty of nature and life (University Abbes Laghrour -Khenchela-).

These six lactic bacteria strains were isolated from the M17 and MRS medium at the time and incubation temperatures equant. The morphological and chemical and physiological tests, and system AIP 20E allowed of identified three strains of *Lactococcus* (a strain *Lactococcus lactis subsp.lactis*, and two strains of *Lactococcus lactis subsp.cremoris*), two *Lactobacillus* strains (*Lb. plantarum*), and a strain *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*). With the dominance of lactic streptococcus genus.

Keywords: Phenotypic characters, Lactic bacteria, Jben, Bouhezza, Lben, Goat milk.

الخصائص المظهرية للبكتيريا اللبنية المعزولة انطلاقاً من منتجات الألبان التقليدية

ملخص

سمح لنا عملنا هذا بدراسة الخصائص المظهرية للبكتيريا اللبنية لثلاث عينات: الجبن التقليدي، اللبن، بوهزة، والمحضرة انطلاقاً من حليب الماعز بمنطقة خنشلة. ولقد تم تحديد هذه الخصائص المظهرية على مستوى مختبر كلية علوم الطبيعة والحياة (جامعة عباس لغرور - خنشلة). ولقد تم عزل 6 سلالات من البكتيريا اللبنية في الوسطين MRS و M17، في أوقات زمنية و درجات حرارة حضانة معتدلة الاختبارات الشكلية والكيميائية والفيزيائية ونظام AIP 20E سمح لنا بالتعرف على: 3 سلالات من *Lactococcus* (سلالة من *Lactococcus lactis subsp.lactis*، وسلالتين من *Lactobacillus* (سلالتين من *Lactobacillus plantarum*) و *Lactococcus lactis subsp.cremoris*) وسلالة من *Lactococcus* (*Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris*) مع هيمنة النوع *Streptocoques lactiques*.
كلمات مفتاحية: الخصائص المظهرية، البكتيريا اللبنية، الجبن التقليدي، بوهزة، اللبن، حليب الماعز.

M^{elle} SERAOUI Selma & M^{elle} MAHDI Nadjat



Date de Soutenance: 30 / 05 /2016

Diplôme : Master académique en Biologie
Option : Microbiologie moléculaire et cellulaire

Thème : Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers traditionnels

Résumé

Notre travail nous a permis d'étudier la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques de trois souches du Djben et Bouhezza, et L'ben préparé à partir du lait de chèvre de la région de khenchela. Cette identification phénotypique a été réalisée au niveau du laboratoire de faculté de science de la nature et de la vie (**Université Abbès Laghrour –Khenchela-**).

Ces six souches des bactéries lactiques ont été isolées sur les milieux M17 et MRS aux temps et température d'incubation équant. Les tests morphologiques et chimiques et physiologiques, et système AIP 20E ont permis d'identifier trois souches de *Lactococcus* (une souche de *Lactococcus lactis subsp.lactis*, et deux souches de *Lactococcus lactis subsp.cremoris*), deux souches de *Lactobacillus* (*Lb. Plantarum*), et une souche *Leuconostoc* (*Leuconostoc méserteroides subsp.cremoris*), avec la dominance du genre *streptocoque lactique*.

Mots clés: Caractères phénotypiques, Bactéries lactiques, Djben, Bouhezza, L'ben, Lait de chèvre.

Jury de soutenance

Présidente: Pr. SEBIHI Fatima zohra (M.A.A) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela.
Encadreur: Pr. THABET Rachid (M.A.A) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela.
Examinatrice: Pr. MERABTI Rima (M.C.B) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela.