



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA-



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE
LA VIE

DEPARTEMENT DU BIOLOGIE MOLECULAIRE
ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Biologie

OPTION: Microbiologie Appliquée

Thème

**Isolement et criblage des bactéries
lactiques autochtones productrices
d'exopolysaccharides**

Réalisé par

- BOUAZIZ Ibtissem
- BOUKHORS Yassmina

Jury de soutenance :

Présidente: Dr. DEROUCHE.F	M.C.B	Université Abbès Laghrour khenchela
Examinatrice: Dr. KHEDOUMA.A	M.C.B	Université Abbès Laghrour khenchela
Encadrante: Dr. MERABTL.R	M.C.A	Université Abbès Laghrour khenchela

Année universitaire 2020/2021

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBESLAGHROUR –KHENCHELA-

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE
LA VIE**

**DEPARTEMENT DU
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Biologie

OPTION: Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement et criblage des bactéries lactiques autochtones productrices d'exopolysaccharides

Réalisé par

- **BOUAZIZ Ibtissem**
- **BOUKHORS Yassmina**

Jury de soutenance :

Présidente: Dr. DEROUICHE.F	M.C.B	Université Abbès Laghrour khenchela
Examinatrice: Dr. KHEDDOUMA.A	M.C.B	Université Abbès Laghrour khenchela
Encadrante: Dr. MERABTL.R	M.C.A	Université Abbès Laghrour khenchela

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Au terme de ce travail, il est agréable de présenter nos remerciements Nos vifs remerciements à tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail :

*Nous remercions **Dr.Derouiche.Fouzia** qui a accepté de présider ce jury.*

*Nos sincères remerciements vont à **Dr.Kheddouma.Asma** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Les plus sincères à notre encadrante **Dr.Merabti Ryma** pour nous avoir proposé ce sujet si intéressant et avoir accepté de nous encadrer et pour son aide, ses conseils, et orientations tout au long de notre travail malgré ses charges professionnelles, Mercie pour votre confiance, souplesse et gentillesse.*

*On souhaite également remercier l'ensemble du personnel travaillant aux laboratoires pédagogique de l'université Abbes Laghrour Khenchela et particulièrement **Mme Mizan Sara**, ainsi que le personnel du département BMC qui ont contribué pour mener à bien ce travail. Nos remerciements vont également à nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire. Enfin, on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Ibtissem  Yassmina



Dédicaces

Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Je dédie ce modeste travail :

À mon très cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi...Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À ma chère mère, Affable, honorable, aimable : Tu représentes le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mon grand cher père et ma grande chère mère

À mes chers frères et mes chères sœurs, la femme de mon cher frère, pour leur compréhension, affection et patience, pour tous les bons moments que nous avons partagés.

*A tous ma famille **Bouaziz***

*À mes collègues de la promotion et toutes mes amies, je cite à part mon binôme **Yasmina** pour son soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.*

A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée.

Ibtissem

Dédicaces

*A ma très chère mère **khadidja***

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes coté pour me consoler quand il fallait.

*A mes chers frères **Nadir, yassine, lazharí, Ramí** et **Amara**, source de joie et de bonheur.*

*A mes belles sœurs **Nassima** et **Souad**, pour leur aide et leur soutien.*

*A mon oncle **Halim** qui me donnent l'amour et de la vivacité.*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé particulièrement **Mariam** et mon binôme **Ibtissem**. Et à qui je souhaite plus de succès.*

Yassmina

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION.....	01
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Le lait.....	02
1. Définition.....	02
1.2. Composition du lait.....	02
1.2.1. Eau.....	02
1.2.2. Les lipides.....	02
1.2.3. Les glucides.....	02
1.2.4. Les protéines.....	03
1.2.5. Autres composés	03
1.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait	03
1.4. Microbiologie du lait.....	03
1.4.1. Flore originelle.....	03
1.4.2. Flore de contamination.....	04
1.5. Valeur nutritive du lait et des produits laitiers.....	04
2. Le lait de vache.....	05
3. Le lait de chèvre.....	05
II. Les bactéries lactiques(BL).....	06
1. Définition et caractéristiques.....	06
2. Habitats des BL.....	06
3. Taxonomie des BL.....	06
4. La classification.....	07
4.1. Lactobacilles et autre bacilles lactiques.....	07
4.1.1. <i>Lactobacillus</i>	07
4.2. <i>Streptocoque et autre coques lactique</i>	07
4.2.1. <i>Streptocoque, Lactococcus, Enterococcus</i>	08

4.2.2. <i>Pediococcus</i>	08
4.2.3. <i>Leuconostoc</i>	08
5. Principales voies fermentaires des BL (homo-fermentaire et hétéro- fermentaire).....	09
5.1. La vois homo-fermentaire	09
5.2. La voie hétéro-fermentaire	09
6. Les applications des bactéries lactiques.....	10
7. Les caractéristiques technologiques	12
7.1. Activité acidifiante.....	12
7.2. Activité protéolytique.....	12
7.3. Production d'arômes.....	13
7.4. Actions pro-biotique.....	13
7.5. Production de polysaccharides.....	13
7.6. Activite bactériostatique (production de bactériocines)	13
III. Les exopolysaccharides (EPS).....	15
1. Les polysaccharides	15
1.1. Classification générale des polysaccharides	15
2. Définition des EPS.....	15
3. La classification des EPS.....	16
3.1. Les homopolysaccharides.....	16
3.2. Les hétéropolysaccharides.....	16
4. La structure des EPS.....	18
5. La biosynthèse des EPS.....	19
5.1. Les homopolymères.....	19
5.2. Les hétéro-polymères.....	19
5.2.1. La biosynthèse des sucres précurseurs.....	19
5.2.2. L'assemblage de l'unité répétitive par les glycosyltransférases.....	20
5.2.3. L'exportation et la polymérisation des EPS.....	20
6. Application technologique des EPS.....	22
REVUE EXPERIMENTALE	
MATERIEL ET METHODES	
I. Isolement des bactéries lactiques à partir de lait de chèvre et de vache.....	24
1. Echantillonnage.....	24
2. Mesure de Ph.....	24

3. Isolement des BL productrice d'exopolysaccharides (EPS).....	25
3.1. Préparation des dilutions.....	25
3.2. Pré-enrichissement.....	25
3.3. Etalement direct	25
4. Purification et identification partielle des isolats lactiques.....	25
4.1. Les caractères morphologiques.....	26
4.2. Examen microscopique	26
5. Test biochimique.....	26
6. Criblage des BL pour la production des exopolysaccharides.....	28
7. Etude du pouvoir protéolytique.....	28
8. Etude de l'activité antimicrobienne	29
8.1. Les souches bactériennes test	29
8.2. Technique de diffusion sur disque	29
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Isollements et identifications des bactéries lactiques à partir de lait de chèvre et de vache.....	30
1.1. Les caractères macroscopiques.....	30
1.2. Les caractères microscopiques.....	31
2. Criblage des bactéries lactiques pour la production des exopolysaccharides.....	33
3. Etude du pouvoir protéolytique.....	35
4. Etude de l'activité antimicrobienne	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AL : L'acide lactique
ATCC: American Type Culture Collection
ATP : Adénosine triphosphate
b:Au moins 50% des liaisons
BL: Bactéries Lactiques
CPS : Capsule
EPS: Exopolysaccharides
FAO: Food and Agriculture Organisation
Fru: Fructose en forme pyranose(p)
g/l : Grammes /Litre
G: Grossissement
G+C: Guanine-Cytosine
Gal: Galactose
GalE: L'enzyme UDP-galactose 4-épimérase
GalU : L'enzyme UDP- glucose pyrophosphorylase
GDP: Guanosine triphosphate
Glc: Glucose
GRAS: Generally Recorinzed As Safe
h : Heure
H : Hydrogène
H₂O: L'eau
H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène
MH: Muller- Hinton
ml: millilitre
mm: millimètre
MRSS: Man-Rogosa et Sharp Saccharose
MSE: Mayeux Sandine et Elikér
NaCl: Chlorure de sodium
NAD⁺/NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
O₂: Oxygène
P: Phosphate
PEP: Pression Expiratoire Positive

PST: Les protéines de transport

RfbA : dTDP-glucose phosphorylase

RmlA: Glucose-IP thymidylyltransférase

TDP: Thymidine diphosphate

TMS: Séquences transmembranaires

UDP : Uridine diphosphate

UFC: Unités Formant Une colonie

Ugd : L'enzyme UDP-glucose dehydrogenase

µl: microlitre

Liste des figures

N°	Le titre de figure	P
1	Arbre phylogénétique des BL	9
2	Représentation schématique des principales voies de fermentations chez les BL.	10
3	Localisation des polysaccharides produite par les grams positifs, (CPS) capsule polysaccharide, (EPS) exopolysaccharide (couche fine).	16
4	Classification des EPS.	17
5	Vue globale du métabolisme des sucre et de la biosynthèse des EPS chez les BL.	21
6	Photos présentant les espèces utilisées dans l'échantillonnage du lait; <i>a/Capna argagrus</i> , <i>b/Bos taurus</i> .	24
7	protocole d'isolement des BL productrices des EPS.	27
8	Protocole de criblage des BL pour la production des exopolysaccharides.	28
9	Exemple des résultats d'isolement des bactéries lactiques sur milieux MRS, MRSS à partir d'échantillon de lait de vache et de lait de chèvre.	30
10	Exemple de résultats de coloration de Gram de quelque isolat.	31
11	Exemple de résultats de test de catalase.	31
12	Photos de colonie mucoïde à gauche; colonie bactérienne ayant un aspect mucoïde, à droite ; filament formé au contact d'une anse de platine avec une colonie bactérienne mucoïde.	34
13	Confirmation de la production d'EPS par le mélange des colonies mucoïdes. A et B ; précipitation des EPS (sécrétions autour des colonies) au contact de l'alcool, C ; la suspension cellulaire opaque dans l'alcool absolu.	34

Liste des tableaux

N°	Le titre de tableau	P
1	Composition moyenne du lait de chèvre et du lait de vache.	5
2	Exemples de souches pro-biotiques disponibles sous forme de compléments alimentaire ou de médicaments.	12
3	Homopolysaccharides produits par les BL.	18
4	Application technologique des EPS.	23
5	Les caractéristiques des échantillons de lait.	30
6	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats sélectionnés et purifiés.	32
7	Résumé de résultats de criblage des BL pour la production des EPS, des activités protéolytiques et l'activité antimicrobiennes.	37

Les exopolysaccharides (EPS), produites naturellement par certaines bactéries lactiques (BL), suscitent un intérêt technologique du à leur capacité de rétention d'eau, de moduler la viscosité des produits fermentés et à leurs certains effets positifs sur la santé. La présente étude a pour but d'isoler des souches lactiques à partir d'échantillons de lait de chèvre et de lait de vache obtenus de la wilaya de Khenchela, ainsi que la mise en évidence de leur aptitude à produire des EPS intitulé dans l'étude suivante : **Isolement et criblage des bactéries lactiques autochtones productrices d'exopolysaccharides** .

Sur la base des critères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, 18 souches de BL ont été isolées et partiellement caractérisées. Le criblage de ces isolats a permis de sélectionner 10 souches productrices d'EPS parmi les 18 isolées. La recherche de la production d'EPS a été menée sur milieux MRS supplémenté en saccharose à 10%, en utilisant des disques de papier filtre qui ont servis de support de culture pour les isolats testés. La précipitation à l'éthanol a permis une confirmation de la production d'EPS. Par ailleurs, les 18 souches ont été également testées afin d'évaluer leurs aptitudes technologiques, notamment, le pouvoir protéolytiques et leurs capacité antagoniste contre *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, mais sans succès.

Les résultats obtenus concernant la production des EPS sont intéressants et méritent d'être complétés par; l'identification moléculaire des isolats ayants manifestés la production des EPS, la confirmation de leur production par des dosages spectrophotométriques, ainsi que la détermination de la structure des EPS sécrétés et la caractérisation de leurs propriétés.

Mots clés: lait, bactéries lactiques, exopolysaccharides, criblage.

The exopolysaccharides (PSE), produced naturally by some lactic acid bacteria (LAB), are of technological interest due to their ability to retain water, modulate the viscosity of fermented products and their certain positive effects on health. The present study aims to isolate lactic strains from samples of goat's milk and cow's milk obtained from the wilaya of Khenchela, as well as highlighting their ability to produce PSE entitled in the following study: **Isolation and screening of indigenous exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria .**

On the basis of macroscopic, microscopic and biochemical criteria, 18 strains of LAB were isolated and partially characterized. The screening of these LAB isolates allowed the selection of 10 PSE-producing strains among the 18 isolated. The investigation of PSE production was conducted on MRS media supplemented with 10% sucrose, using filter paper discs as culture medium for the tested isolates. Ethanol precipitation allowed confirmation of PSE production. In addition, the 18 strains were also tested in order to evaluate their technological abilities, notably, the proteolytic power and their antagonistic capacity against *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, but without success.

The results obtained concerning the production of PSE are interesting and deserve to be completed by; the molecular identification of the isolates having manifested the production of PSE, the confirmation of their production by spectrophotometric assays, as well as the determination of the structure of secreted PSE and the characterization of their properties.

Key words: milk, lactic bacteria, exopolysaccharides, screening.

تفرز بكتيريا حمض اللاكتيك (BL) سكريات خارجية (EPS) طبيعيا و التي بدورها لها أهمية في مجالات متعددة نظرا لقدرتها على الاحتفاظ بالماء, تعديل لزوجة المنتجات المخمرة و أيضا لها قدرة ايجابية عالية في مجال الصحة. إذن نتطرق إلى الهدف الأساسي و هو عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من حليب الماعز و البقر التي تم الحصول عليها من ولاية خنشلة و ثبات قدرتها على فرز سكريات الخارجية المعنون في الدراسة التالية : عزل و فحص بكتيريا حمض اللاكتيك الأصلية المنتجة لسكريات خارجية .

بناء على معايير مجهرية كيميائية حيوية تم عزل 18 سلالة من بكتيريا اللاكتيك. تم اختيار 10 سلالات التي تفرز سكريات الخارجية , و هذا الأخير تم في وسط مكمل ب 10 % سكاروز باستخدام أفراس الترشيح من اجل عزل بكتيريا المفزرة لسكريات الخارجية, و بعد ذلك تم تأكيد إنتاج بترسيب في محلول الإيثانول ,من جهة أخرى تم اختبار 18 سلالة على قدرتها التكنولوجية على وجه الخصوص التحلل البروتيني و الصراع ضد : *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و لكن بدون نتيجة ايجابية .

النتائج التي تم الحصول عليها فيما يتعلق إنتاج سكريات خارجية لها أهمية بالغة وتستحق استكمالها ب:

التحديد الجزيئي لبكتيريا حمض اللاكتيك المنتجة ل سكريات الخارجية ,تأكيد إنتاجها عن طريق الفحص الطيفي كذلك تحديد بنية و خصائص سكريات الخارجية الذي تم عزله .

الكلمات المفتاحية: حليب, بكتيريا ,حمض اللاكتيك, سكريات خارجية .

Introduction

Générale

Les bactéries lactiques (BL) sont connues depuis longtemps pour leurs nombreuses applications dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentation lactiques, les BL assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité sanitaire (**Carine et Philippe, 2009**). Mais récemment, les BL ont suscité un intérêt pour leur capacité à sécréter des polysaccharides extracellulaires. Ces polysaccharides extracellulaires ou "exopolysaccharides" (EPS) ont un immense potentiel commercial (**Ptale et al, 2011**).

En raison de leurs propriétés physico-chimiques utiles à l'industrie. La capacité des BL à produire une large gamme d'EPS de composition et de fonctionnalité variables élargit leurs applications industrielles. Les BL associées à l'alimentation ont le statut de "généralement reconnues comme sûres" (GRAS) et sont découvertes comme étant des candidats appropriés pour la production d'EPS fonctionnels. Ces BL sûres qui produisent in situ de nouveaux EPS fonctionnels peuvent échapper aux tests toxicologiques rigoureux et la commercialisation de ces EPS offre d'énormes perspectives. Ces souches de BL produisant des EPS sont utilisées pour la production de yaourt, de fromage, de lait acidophile et de desserts à base de lait. L'utilité des différents EPS dépend de leur composition en monosaccharides, du type de liaisons présentes, du degré de ramification et du poids moléculaire (**Walmen et al, 2003**).

Les EPS dérivés des BL jouent un rôle crucial dans l'amélioration de la rhéologie, de la texture, de la sensation en bouche des formulations alimentaires fermentées et confèrent des effets physiologiques bénéfiques sur la santé humaine, tels que l'activité anti-tumorale, la bioactivité immunomodulatrice et l'anticarcinogénicité (**Walmen et al, 2003**).

L'objectif de ce projet de fin d'étude, consiste à sélectionner des souches lactiques autochtones et de mettre en évidence leurs propriétés technologiques notamment la production d'EPS.

Pour répondre à cet objectif, le manuscrit sera structuré en trois principales parties; la première est une revue bibliographique faisant état des points suivants : le lait, les propriétés technologiques des BL et en fin les EPS et leurs applications, la seconde partie présente, matériel et méthodes, synthétisant l'ensemble des expérimentations réalisées dans ce mémoire., la troisième partie de ce manuscrit rassemble les résultats obtenus et leur discussions, et s'achèvera par une conclusion générale et des perspectives.

Revue

Bibliographique

Le lait

I. Le lait

1. Définition

Le lait et le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (premier lait de la femelle) (**Joffin et al, 2010**).

Le lait est un liquide de sécrétion des glandes mammaire, glande spécifique des mammifères, sécrété normalement par la femelle pour la nourriture des petites après la mise bas (**Joffin et al, 2010**).

Dans la plupart des civilisations humaines, le lait des animaux domestiques (vache brebis, chèvre, jument, yak, chamelle, dromadaire, bufflonne renne) est couramment consommé, mais l'industrialisation concerne principalement le lait de vache, et à plus petite échelle, le lait de brebis et de chèvre (**Vilain, 2010**).

1.2. Composition du lait

Le lait de chaque espèce de mammifères est particulièrement adapté aux besoins du nourrisson, sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces, et même selon les races, et selon le stade de lactation pour s'adapter aux besoins (**Vilain, 2010**).

1.2.1. Eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion, la présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire (permet de former une solution varie avec les substances polaire telle que les glucide, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum (**Alixander et al, 2008**).

1.2.2. Les lipides

Les lipides sont constitués d'un mélange d'acides gras en suspension dans le lait sous forme de gouttelettes, ils forment une émulsion. Ils constituent la partie la plus variable du lait ; la concentration varie de 10 à 500 g/l suivant les espèces. Ils sont constitués à 99 % de triglycérides (**Vilain, 2010**).

1.2.3. Les glucides

Ils sont représentés à 97 % par le lactose, disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose (**Vilain, 2010**).

En effet, en plus de son rôle nutritionnelle lactose joue un rôle technologie dans les produits laitiers en tant que substrat de fermentation pour les bactéries lactiques qui l'hydrolysent en glucose et galactose, puis transforment ces hexoses en acide lactique, la teneur en lactose des produits laitiers est donc plus faible .L'industrie agro-alimentaire développe ce créneau en commercialisant des laits « faciles à digérer » contenant de la lactase et diminuant ainsi la teneur en lactose du produit fini (**Vilain,2010**).

1.2.4. Les protéines

Tous les laits de mammifères ont la même composition protéique de base et il y a de fortes homologues de structure entre les protéines de lait des différentes espèces : 85 % entre lait de vache et lait de brebis ou le lait de chèvre, 97 % entre le lait de brebis et le lait de chèvre. Plus les espèces sont proche, plus les homologues sont importantes, ce qui explique les réactivités croisées entre les laits de différentes espèces (**Vilain, 2010**).

1.2.5. Autres composés

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

1.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait

Les propriétés physico-chimiques du lait dépendent de l'ensemble des constituants du lait, les principales propriétés du lait sont les suivants :

- ❖ La densité varie entre 1,028 et 1,035 à 15°C.
- ❖ L'acidité de 15 à 17°D.
- ❖ Le point d'ébullition à 100.5°C.
- ❖ Le point de congélation de -0,530°C à -0,575°C. Un point de congélation supérieur à -0,530°C est soupçonné par l'addition de l'eau.
- ❖ pH de 6,6 à 6,8(**El Hachemi , 2019**).

1.4. Microbiologie du lait

Le lait est, de par sa composition, un aliment très favorable au développement des microorganismes, le lait est utilisé sous de nombreuses formes et il est la matière première de nombreux produits alimentaires (**Guiraud et al, 2012**).

1.4.1. Flore originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsque est prélevé dans de bonnes

conditions à partir d'un animal sain (moins de 10 g/ mL), il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores: *microcoques* mais aussi *Streptocoques lactiques (Lactococcus) Lactobacilles*, le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « lacténines» mais leur action est de très courte durée (1 heure environ)(**Guiraud et al,2012**).

D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire, il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections des streptocoques pyogènes, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi des germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalie du pis : *Salmonella*, *Brucella* (agent de la fièvre de Malte), et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*,(agent de la listeriose), *Mycobacterium*(agent de la tuberculose), *Bacillus anthracis*(agent du charbon) , *Coxiellabumetthii*(agent de la fièvre O), et quelques virus(**Guiraud et al,2012**).

1.4.2. Flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- ❖ **Fèces et téguments de l'animal :** *Coliformes*, *Entérocoques*, *Clostridium*, éventuellement Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) etc.
- ❖ **Sol:** *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques etc.
- ❖ **Litières et aliments:** flore banale variée, en particulier *Lactobacilles*, *Clostridium butyriques* (ensilages).
- ❖ **Air et eau:** flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, etc.
- ❖ **Equipement de traite et de stockage du lait:** microcoques, levures et flore lactique avec *Lactobacilles*, *Streptocoques (Streptococcus, Lacto-coccus, Enterococcus)*, *Leuconostoc*, etc. Cette flore est souvent spécifique d'une usine.
- ❖ **Manipulateurs:** *Staphylocoques* dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contaminations fécales, etc.
- ❖ **Vecteurs divers (insectes en particulier):** flore de contamination fécale.

Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait (**Guiraud et al, 2012**).

1.5. Valeur nutritive due lait et des produits laitiers

Le lait et les œufs sont les seuls aliments complets connus à l'état naturel du fait qu'ils contiennent des quantités significatives des quelque 55 nutriments essentiels à la vie, en

regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration en nutriments, on le considère donc comme un aliment de forte densité nutritionnelle, le lait n'est cependant pas un aliment parfait, car il ne contient pas à l'état naturel de fibres et que son contenu en certains nutriments, dont le fer et la vitamine D, demeure relativement faible(Vignola,2002).

Suivant les espèces animales et les races au sein d'une même espèce ; elle varie également chez une même laitière en fonction de la période de la lactation et de l'alimentation. C'est pour cette raison qu'on ne peut parler que de compositions moyennes (Kont, 1999)(Tableau 1).

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de chèvre et du lait de vache (Vignola, 2002).

Composition	Lait de vache (%)	Lait de chèvre(%)
Eau	87,5	87,0
Protéines	3,2	2,9
Glucides	4,6	4,4
Minéraux	0,8	0,9
Matière grasses	3,7	3,8

2. Le lait de vache

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en B-carotène de sa matière grasse, sa saveur est douce et son odeur faible, mais identifiable (Fanica, 2002).

3. Le lait de chèvre

Lait de chèvre et caractérisé par sa couleur blanche due à l'absence de bêta carotène, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre se digère plus facilement que le lait de vache et il est donc recommandé pour les bébés et les personnes qui supportent mal ce dernier, de plus il est naturellement homogénéisé car il est dépourvu d'une protéine, l'agglutinine(Belarbi,2011).

Les bactéries

lactiques

II. Les bactéries lactiques(BL)

1. Définition et caractéristiques

Les BL sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. non pathogènes. Elles ont un métabolisme anaérobie facultatif et ne produisent pas de catalase, immobile, non sporulée (**Savado** *et al*, 2011).

Les BL forment un groupe hétérogène composé de coques (*Streptocoques*) et de bacilles (*Lactobacilles*), qui produisent de l'acide lactique (AL) par voie fermentaire, il faut signaler que d'autres bactéries productrices d'AL sont classées dans le groupe (*Entérobactérie*, *Staphylocoques*, *Bacillus*) (**Badis et al**, 2005).

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux produits alimentaires. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et la composition aromatique (**Savado** *et al*, 2011).

2. Habitats des BL

Les BL sont présentes et répandues dans la nature, qui se trouve dans des habitats riches en nutriments, elles peuvent coloniser de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les poissons, les végétaux, les légumes, les céréales, les boissons, les eaux et le miel. Leur présence a été aussi marquée au processus d'ensilage. Les BL font partie de la flore buccale, intestinale, et vaginale humaine ou animale (**Yu et al**, 2020).

3. Taxonomie des BL

La taxonomie est la science qui permet de classer rationnellement les organismes vivants en groupes d'affinité ou taxons, la taxonomie et la nomenclature sont les deux disciplines de la systématique dont la principale application est l'identification des espèces (**Alexandre et al**, 2008).

Le concept de BL comme groupe de micro-organismes date de 1900. Ce groupe est caractérisé par un phénotype commun, bactéries à Gram-positif, non mobiles, ne formant pas de spores, en forme de coques ou bâtonnets, fermentant les sucres en AL (**Alexandre et al**, 2008).

L'approche classique de taxonomie bactérienne est fondée sur les caractéristiques morphologique et physiologique auxquelles s'est ajoutée la composition pariétale, les acides gras, mais les caractéristiques moléculaires comme le pourcentage de G+C de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence des ARNr, sont devenus des outils

taxonomiques importants. Ces outils ont conduit à des changements notables dans la classification des BL (Alexandre *et al*, 2008).

Les caractéristiques morphologiques et fermentaires permettent de distinguer les genres et les espèces, les BL sont caractérisées par un métabolisme hétéro-fermentaire ou homo-fermentaire, les bactéries homo-fermentaires produisent de l'AL à partir du glucose ou du fructose, les bactéries hétéro-fermentaires produisent en plus de l'AL du CO_2 de l'éthanol et de l'acide acétique à partir du glucose (Alexandre *et al*, 2008).

4. La classification

Les BL regroupent de nombreux genres bactériens (Figure 1).

4.1. Lactobacilles et autres bacilles lactiques

4.1.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae* il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans beaucoup d'industries alimentaires (Guiraud et Rosec, 2004).

Les *Lactobacillus* sont des Gram +, asporulés, groupés en paire ou en chaînes, immobiles, catalase -, micro aérophiles ou anaérobies, certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétéro-lactiques, leur température optimale de croissance est 30°C, et les *Lactobacillus* exigent pour leur développement des milieux bien adaptés riches en acides aminés, vitamines, acides gras, ils sont acidophiles, ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (Guiraud et Rosec, 2004).

4.1.2. *Bifidobacterium*

Anciennement *Lactobacillus bifidus*, est un bacille Gram +, catalase -, immobile, anaérobie, présent dans la flore intestinale du nouveau-né, il est utilisé dans certains yaourts, sa présence entraînerait un effet anti-infectieux au niveau intestinal dû à la présence de facteurs bifidogènes (Guiraud et Rosec, 2004).

4.2. Streptocoque et autres coques lactiques

Ces coques Gram + à exigences parfois complexes se rencontrent dans des produits alimentaires riches, L'appellation (*Streptocoque*) regroupe des genres très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation lactique, il s'agit de coque Gram+, asporulés, immobile, généralement groupés en paire et surtout en

chaînes de longueur variable, catalase - (**Guiraud et Rosec, 2004**).

La différence entre les groupes est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (**Guiraud et Rosec, 2004**).

4.2.1. *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus*

Ce sont des germes anaérobies facultatifs, généralement micro aérophiiles et très exigeants au point de vue nutritionnel, ils se développent bien à 37°C. La plupart des espèces ne sont pas en général capsulées, homolactiques, ils ont fréquemment un pouvoir hémolytique (**Guiraud et Rosec, 2004**).

Quelques espèces sont pathogènes en dehors du cadre alimentaire elles peuvent cependant se retrouver dans les aliments et provoquer des infections, De nombreuses autres sont saprophytes, en particulier dans les produits laitiers certaines espèces sont abondamment utilisées dans les industries de fermentation lactique, ce sont les agents d'acidification et de coagulation lactique en fromageries (**Guiraud et Rosec, 2004**).

4.2.2. *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des germes micro aérophiiles à besoins nutritifs complexes, leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. De nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles, homolactiques, ils sont saprophytes et contaminent les produits végétaux (**Guiraud et Rosec, 2004**).

4.2.3. *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel ils se développent entre 20 et 30 °C, ils sont généralement capsulés, cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu, leur fermentation hétéro-lactique donne de l'acide lactique, ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes, ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés, ils sont responsables de la fermentation Malo-lactique des vins, ils sont utiles dans certains fromages, ils interviennent aussi dans les ensilages et les végétaux fermentés (**Guiraud et Rosec, 2004**).

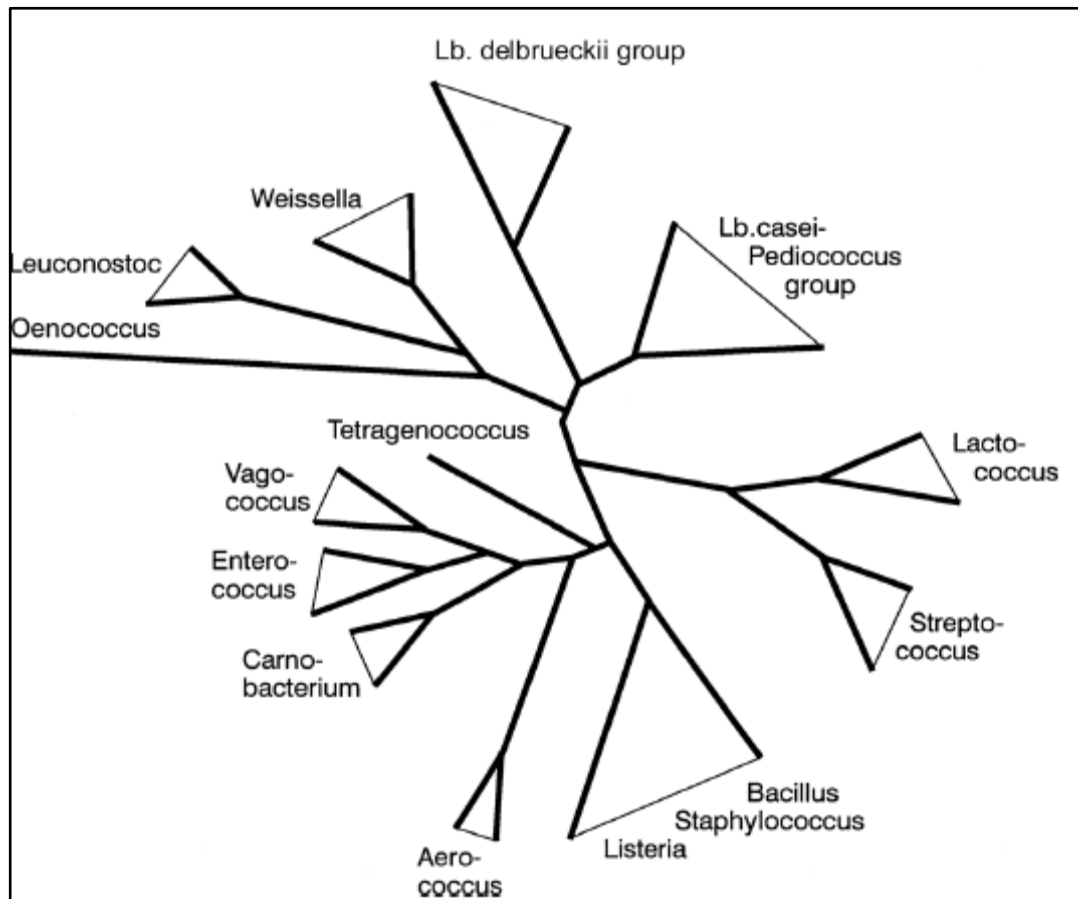


Figure 1: Arbre phylogénétique des BL (Salminen *et al*, 2004).

5. Principales voies fermentaires des BL (homo-fermentaire et hétéro-fermentaire)

Les BL sont caractérisées par la production d'AL comme principal produit métabolique final de la fermentation des glucides, en raison de l'absence d'un système respiratoire fonctionnel, les BL obtiennent de l'énergie par la phosphorylation au niveau du substrat en suivant deux voies métaboliques, pour la fermentation de l'hexose, c'est-à-dire homo-fermentaire et hétéro-fermentaire, comme le montre la Figure 2 (Mora-Villalobose *et al*,2020).

5.1. La vois homo-fermentaire

Cette voie est basée sur la glycolyse et produit principalement de l'AL (Mora-Villalobose *et al*, 2020).

5.2. La voie hétéro-fermentaire

Cette voie connu sous le nom du pentose phosphate, est caractérisée par la production de CO_2 et d'éthanol ou d'acétate en plus des AL (Mora-Villalobose *et al*, 2020).

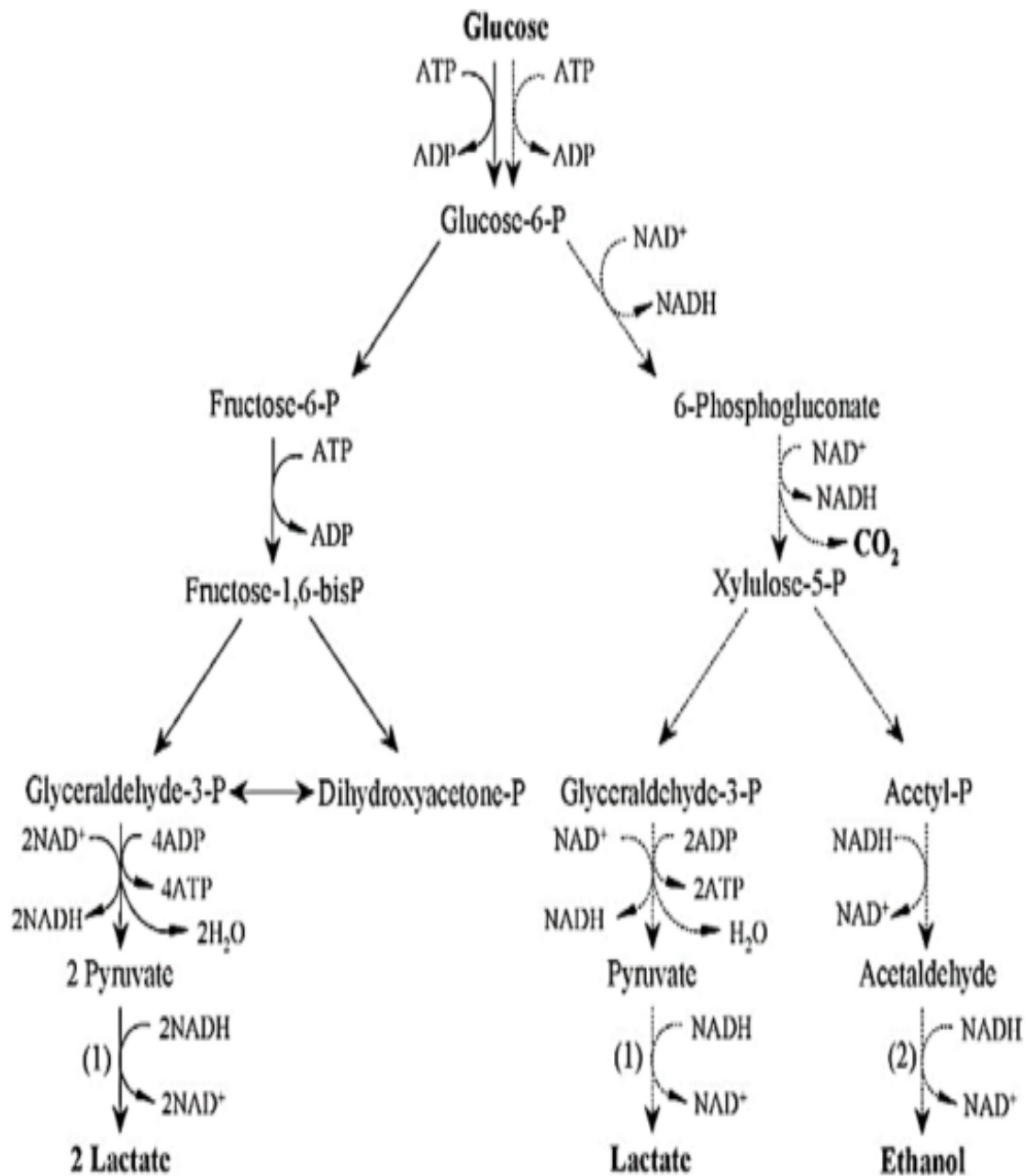


Figure 2: Représentation schématique des principales voies de fermentations chez les BL (Mora-Villalobose *et al*, 2020).

6. Les applications des bactéries lactiques

Le groupe des BL comprend environ 20 genres différents, ceux qui sont importants pour les applications techniques dans l'industrie alimentaire comprennent *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*. Les BL jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments et contribuent à leurs propriétés nutritionnelles, sensorielles et sanitaires (Li *et al*, 2018)(Tableau 2).

Les BL sont utilisées comme ferments dans divers produits alimentaires tels que le yaourt, le fromage, les saucisses et les légumes fermentés. Les BL les plus importantes utilisées comme starters dans la fermentation laitière *Lc. Lactis*, *St. Thermophilus*, *Bulgaricus*, et *Leuconostoc spp* (Li et al,2018).

Les BL ont plusieurs fonctions importantes dans les fermentations alimentaires :

- ❖ la production de dioxyde de carbone dans les fromages.
- ❖ la production de composés aromatiques dans de nombreux produits laitiers.
- ❖ L'insitu-production de produits contenant du de certains sucres ou de polymères de grande valeur pour une utilisation industrielle ou clinique.
- ❖ la conservation des aliments par l'acidification du milieu (pH3,5-4,5) et la production de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines et les composés organiques.
- ❖ les rôles probiotiques dans les aliments fonctionnels.

Les probiotiques sont des cultures microbiennes vivantes qui contribuent à la santé et à la nutrition de L'hôte. Plusieurs *Lactobacillus spp*, et *Bifidobacterium spp* sont connus pour être bénéfiques à la santé humaine en agissant comme des probiotiques. Les bienfaits des probiotiques pour la santé comprennent la modulation du microflora intestinal, la production d'agents antimicrobiens, le blocage de l'adhésion des agents pathogènes et la modulation de la réponse immunitaire (Li et al, 2018).

Les BL sont des organismes puissants et des usines cellulaires qui produisent des protéines et des peptides antigéniques et thérapeutiques, le tableau présente une liste de diverses espèces de BL (y compris les bifidobactéries) utilisées comme pro-biotiques ou pour des applications biotechnologiques (Li et al, 2018).

Tableau 2: Exemples de souches pro-biotiques disponibles sous forme de compléments alimentaire ou de médicaments (**Driider et Prévost, 2009**).

Les BL	Probiotiques	Applications technologiques
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium lactis Bb12</i>	Chr Hansen
	<i>Bifidobacterium animalis DN173010</i>	Danone
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Valio
	<i>Lactobacillus johnsonii La1</i>	Nestlé
	<i>Lactobacillus casei DN114001</i>	Danone
	<i>Lactobacillus caseiShirota</i>	Yakult
	<i>Lactobacillus salivarius UCC118</i>	Univ.College of cork
	<i>Lactobacillus reuteri SD2112/MM2</i>	Biogaia
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium SF568</i>	Aria Food

7. les caractéristiques technologiques

Cette sélection s'effectue selon des critères technologiques, les principales fonctions des ferments étant la production d'acide de gaz et d'arôme, la protéolyse, la lipolyse et l'inhibition de bactérie indésirables. La caractérisation technologique se fait donc sur les critères suivants :

7.1. Activité acidifiante

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments celle-ci a différents buts :

- ❖ La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure)et l'augmentation de la synérèse du caillé.
- ❖ La participation aux propriétés rhéologiques du produit final.
- ❖ L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (**Mami, 2013**).

7.2. Activité protéolytique

Les BL ont des protéases, qui sont des peptidases nécessaires à la dégradation des

protéines du lait en peptides et acides aminés. Ils peuvent ensuite être transformés en alcools et en acides. Par conséquent, cette activité protéolytique affectera le rendement, la texture et la saveur typique du fromage, ce qui à son tour affecte les caractéristiques du produit final. Arôme: La protéolyse provoquée par le BL produit principalement des peptides courts et des acides aminés libres, précurseurs de nombreux produits aromatiques (Mami, 2013).

7.3. Production d'arômes

Les BL synthétisent un certain nombre d'arômes, le diacétyl et l'acétaldéhyde étant considérés comme les plus importants. La production de diacétyl est généralement associée à la fermentation du citrate. Cette fermentation dépend du pH du milieu, de la présence d'oxygène, de l'agitation du milieu, de la teneur en citrate et de certains facteurs de croissance (oligoéléments par exemple). Les *Lactobacilles* synthétisent de l'acétaldéhyde. La teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (Vignola, 2002).

7.4. Actions pro-biotiques

Les BL sont de plus en plus utilisées dans la nutrition humaine et animale en raison de leurs propriétés probiotiques. Parmi ces effets: l'acide lactique des bactéries avec propriétés anti-tumorales peuvent être dus à l'inactivation ou la suppression des substances cancérogènes dans la cavité gastro-intestinale, la prévention et traitement de la diarrhée due aux infections gastro-intestinales; la baisse de la cholestérolémie en réduisant l'absorption intestinale du cholestérol endogène et exogène et en diminuant la synthèse du cholestérol dans le foie (Ghalouni, 2019).

7.5. Production de polysaccharides

Certaines souches de BL produisent des polysaccharides appelés exopolysaccharides EPS. Au moins trois produits utilisent des souches productrices d'EPS: le yogourt, les fromages à teneur réduite en gras et certains fromages de mozzarella. La production d'EPS est affectée par la température, le pH et la composition du milieu de culture (Vignola, 2002).

7.6. Activité bactériostatique (production de bactériocines)

Les bactériocines, telles que la nisine ou la phytocine, sont des molécules protéiques dont l'effet antibactérien est spécifique à quelques espèces bactériennes. Ces substances sont produites par certaines bactéries, qui inhibent la croissance de différentes souches (*Listeria* et *Clostridium*) et contribuent également à maintenir l'équilibre microbien et sensoriel du

fromage. La BL produit une substance antimicrobienne de type protéine appelée bactériocine. Cette propriété est utilisée dans l'industrie pour détruire les bactéries pathogènes qui ne sont pas nécessaires dans la fabrication des aliments, comme la nisine, produites par *Lactobacillus*, contre *Bacillus* et *Clostridium* (Mami, 2013).

Les exo

polysaccharides

III. Les exopolysaccharides (EPS)

1. Les polysaccharides

De par leurs propriétés stabilisantes, gélifiantes et épaississantes, des polymères de haut poids moléculaire présentent un intérêt particulier lors de l'élaboration de produits alimentaires, ainsi, des polymères biologiques d'origine végétale (pectine, gomme de guar, carraghénane, ou alginate) ou animale (gélatine et caséine) sont fréquemment employés dans l'industrie alimentaire, l'addition de ces différents polymères contribue aux qualités des produits finis en intervenant dans différents processus: cristallisation, floculation, mise en émulsion, blocage de la synérèse, de plus, la fixation d'eau par ces polymères très hydrophiles participe aux propriétés de viscosité du produit fini (Lupien, 1995).

Les polysaccharides d'origine végétale doivent être chimiquement modifiés pour obtenir les propriétés rhéologiques souhaitées du lait c'est pourquoi les polysaccharides d'origine microbienne constituent une alternative intéressante pour l'industrie (Lupien, 1995).

1.1. Classification générale des polysaccharides

Ils peuvent être regroupés en trois classes selon leur localisation au sein de la cellule:

- ❖ **les polysaccharides intracellulaires** : présents dans le cytosol et utilisés comme réserve par la cellule,
- ❖ **les polysaccharides constituant l'enveloppe cellulaire**: tels que les acides téichoïques, lipo-téichoïques ou le peptidoglycane.
- ❖ **les polysaccharides extracellulaires ou (EPS)**: inclut les polysaccharides associés à la surface cellulaire et ceux libérés dans le milieu extracellulaire, Selon leur relation avec l'enveloppe cellulaire, ces EPS ont des noms variés: capsule (CPS, terme utilisé en particulier chez les bactéries pathogènes), microcapsule polysaccharidique, lipo-polysaccharide (Lupien, 1995).

3. Définition des EPS

Les EPS sont des polysaccharides à longue chaîne constitués d'unités ramifiées et répétées de sucres ou de dérivés de sucres, ces unités de sucre sont principalement le glucose, le galactose et le rhamnose, dans des proportions différentes, ils sont sécrétés dans leur environnement pendant la croissance et ne sont pas fixés de façon permanente à la surface de la cellule microbienne cela les distingue des polysaccharides capsulaires (CPS),

structurellement similaires, qui restent fixés de façon permanente à la surface de la cellule (Figure 3) (Walmen *et al.*, 2003).

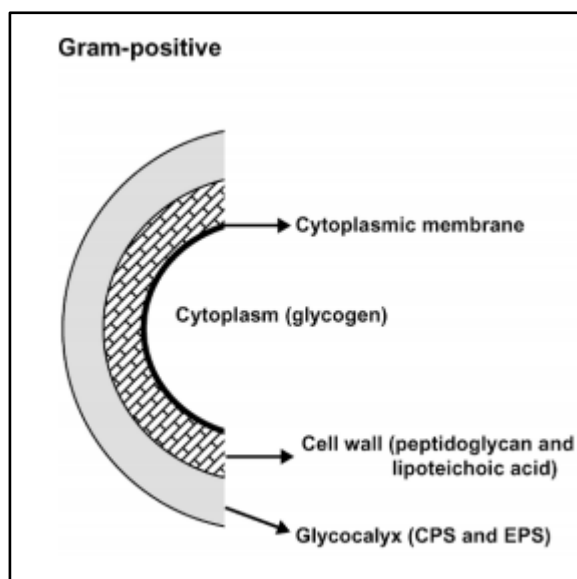


Figure 3: Localisation des polysaccharides produite par les grams positifs, (CPS) capsule polysaccharide, (EPS) exopolysaccharide (couche fine) (Ruas-Madiedo *et De Los Reyes-Gavilan*, 2005).

3. La classification des EPS

La grande diversité de composition et de structure des polysaccharides évoquée. Deux classes sont alors définies :

3.1. Les homopolysaccharides

Chez les bactéries, les homopolysaccharides ne sont composés que de monosaccharides neutres identiques (glucose, fructose ou galactose). Ils se divisent en quatre groupes selon le résidu impliqué dans la composition : les α -D-glucanes, les β -D-glucanes, les fructanes et les polygalactanes composés respectivement d' α -glucose, de β -glucose, de fructose et de galactose (Figure 4) (Clothilde, 2014).

3.2. Les hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides regroupent des polymères dont l'unité répétitive comporte deux à sept résidus osidiques différents. Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc) ou encore aminés (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine). Ils sont par ailleurs fréquemment sujets à des

additions de substituants organiques (exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité(Figure 4)(Clothilde,2014).

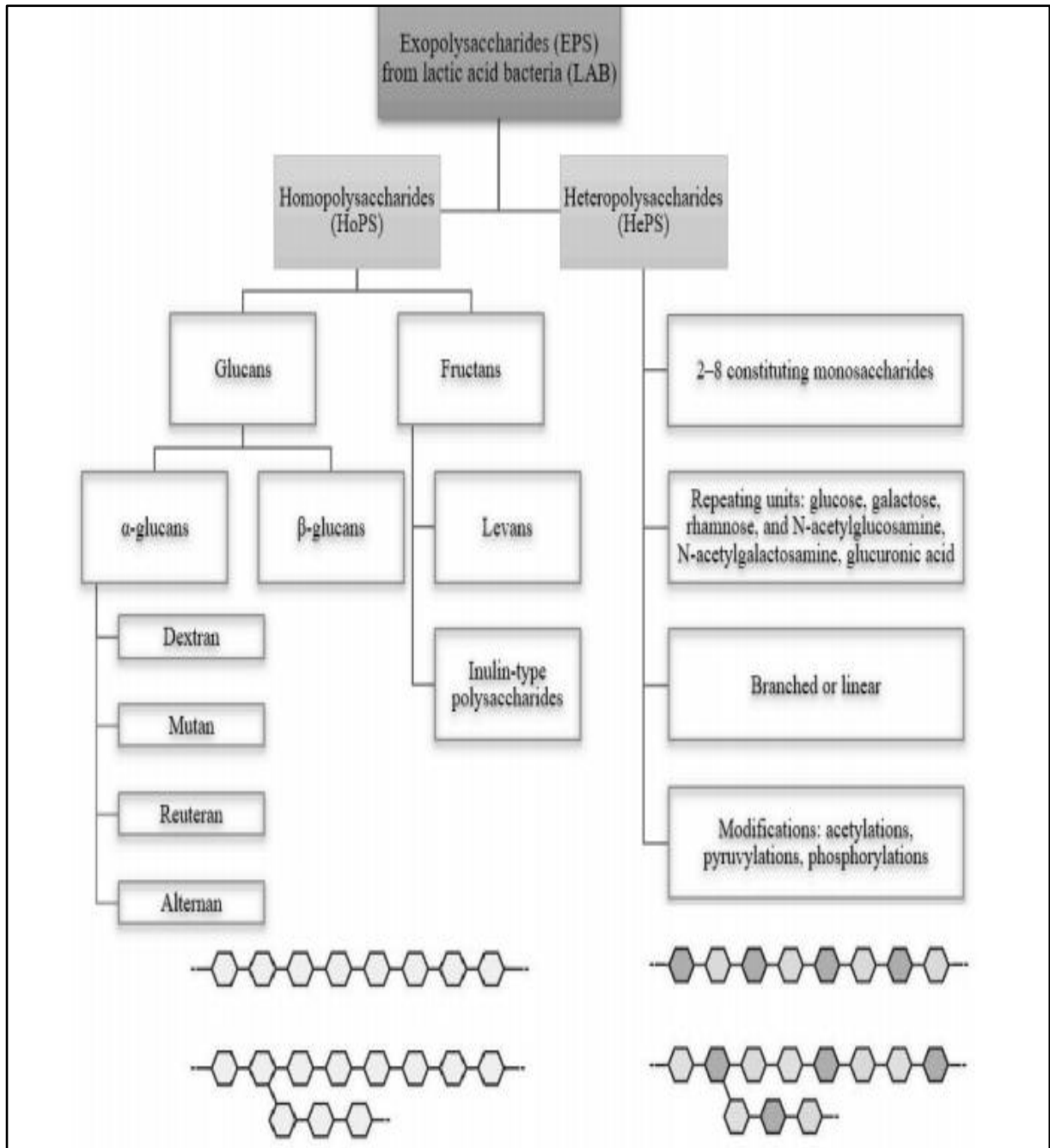


Figure 4 : Classification des EPS (Korc et Varga, 2021).

4. La structure des EPS

Les homopolysaccharides sont composés soit de glucose soit de fructose. Les hétéropolysaccharides consistent en unités répétitives de plusieurs sucres différents. Il existe une diversité considérable de compositions et de structures des EPS parmi les BL, même à l'intérieur de la même espèce. Le glucose, le galactose et le rhamnose sont les sucres retrouvés le plus souvent. Les monosaccharides sont liés par des liaisons glycosidiques α ou β entre le carbone 1 d'un monosaccharide et un des carbones 2, 3,4 ou 6 du monosaccharide suivant (Driider et Prévost, 2009).

Ainsi la structure du polysaccharide peut être linéaire ou posséder des embranchements de longueurs variables. Les embranchements et la proportion de liaisons des différents types déterminent la rigidité de la chaîne, la solubilité des polysaccharides est corrélée avec le type de liaisons (Driider et Prévost, 2009).

Chaque EPS possède une masse molaire modale, qui peut varier de 1.0×10^4 jusqu'à 6×10^6 . Le mécanisme permettant de contrôler la longueur des chaînes de polysaccharides lors de leur biosynthèse n'est pas élucidé à ce jour (Driider et Prévost, 2009)(Tableaux 3).

Tableau 3 : Homopolysaccharides produites par les BL(Driider et Prévost, 2009).

EPS	Types de liaisons	Espèces
α-D-glucanes		
Dextrane	α -D-Glcp ^b (1-6)	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp Mesenteroides</i> <i>Leuconostoc mesenteroides ssp Dextranicum</i>
Mutane	α -D-Glcp ^b (1-3)	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>
Alternane	α -D-Glcp (1-3)/ (1-6)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
β-D-glucanes		
	β -D-Glcp(1-3)/(1-2)	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Propionibacterium freudenreichii ssp Shermanii</i>
	β -D-Glcp (1-3)	<i>Pediococcus spp</i> <i>Streptococcus spp</i>
Fructanes		
Levaines	β -D-Frup (2-6)	<i>Streptococcus salivarius</i>
Type inuline	β -D-Frup (2-1)	<i>Streptococcus mutans</i>

Glc: Glucose, Gal: Galactose, Fru: Fructose en forme pyranose(p),

b: Au moins 50% des liaisons

5. La biosynthèse des EPS

5.1. Les homopolymères

Les polymères sont synthétisés à l'extérieur de la cellule par des transglycosylases, aussi appelés glykansucrases. Le clivage du saccharose fournit l'énergie pour la polymérisation du glucose ou du fructose. Les fructanes sont des polymères de fructose, tandis que les glucanes sont des polymères de glucose. Les glucansucrases, les levansucrases et les fructansucrases sont donc des enzymes extracellulaires (**Driider et Prévost, 2009**).

En présence de saccharose et d'un sucre accepteur comme le maltose, les glykansucrases effectuent la synthèse d'oligosaccharides de faible poids moléculaire au lieu des polymères à haute masse moléculaire. Les glucooligosaccharides sont formés à partir du glucose et les fructooligosaccharides, comme l'inuline, à partir du fructose (Figure 5) (**Driider et Prévost, 2009**).

5.2. Les hétéro-polymères

5.2.1. La biosynthèse des sucres précurseurs

Les précurseurs des EPS sont les sucres nucléotidiques comme l'UDP-glucose, l'UDP-galactose et le dTDP-rhamnose, qui sont synthétisés à partir du glucose-1-phosphate. Les sucres sont ainsi déviés de la glycolyse, et ne sont plus disponibles à la cellule pour la production d'énergie (**Driider et Prévost, 2009**).

Les ribonucleotides utilisées peuvent provenir d'une voie de récupération par le catabolisme des nucléotides préexistants. Les désoxyribonucleotides sont formés par réduction des ribonucleotides. L'UDP-glucose et le dTDP-glucose sont formés respectivement par les enzymes UDP-glucose pyrophosphorylase (GalU) ou dTDP-glucose phosphorylase ou glucose-1P thymidyltransférase (RfbA ou RmlA). Le dTDP-glucose est converti en dTDP-rhamnose par l'action de trois enzymes: dTDP-glucose 4,6-déshydratase, dTDP-6-déoxy-D-xylo-4-hexulose-3,5-épipimérase et dTDP-6-déoxy-D-xylo-4-hexulose-4-reductase (**Driider et Prévost, 2009**).

L'enzyme UDP-glucose dehydrogenase (Ugd) permet de convertir l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique. L'UDP-galactose est formé à partir de l'UDP-glucose par l'enzyme UDP-galactose 4-épipimérase (GalE). Le galactose qui est transporté à l'intérieur des cellules par le biais d'une perméase est phosphorylé par une galactokinase, ce qui donne le galactose-1-phosphate, qui est ensuite converti en UDP-galactose, aux dépens d'une molécule d'UDP-

glucose. Par contre, le galactose devient le galactose-6-phosphate, qui peut entrer dans la voie de synthèse EPS seulement par l'activité du fructose-1,6-biphosphatase et du phosphoglucose isomérase (**Driider et Prévost, 2009**).

Le fructose-6-phosphate est un intermédiaire de la glycolyse qui est considéré comme un deuxième métabolite central pour la biosynthèse des sucres nucléotidiques. Le précurseur UDP-N-acetylglucosamine est synthétisé à partir du fructose-6-phosphate, puis l'enzyme UDP-N-acétyl-glucosamine 4-épimérase s'occupe de former l'UDP-N-acétyl-galactosamine. Le GDP-fucose et le GDP-mannose sont aussi formés à partir du fructose-6-P, mais via le métabolisme fructose-mannos(**Driider et Revost, 2009**).

5.2.2. L'assemblage de l'unité répétitive par les glycosyltransférases

La biosynthèse des EPS nécessite l'assemblage de chaque sous-unité individuelle sur un transporteur lipidique, qui pourrait être un décaprénylphosphate, par l'action séquentielle des glycosyltransférases. Les glycosyltransférases catalysent le transfert des sucres à partir des sucres nucléotidiques en formant la liaison avec la molécule réceptrice. Les liaisons entre les sucres sont généralement de nature glycosidiques, mais certains sucres sont liés par un groupement phosphate (**Driider et Prévost, 2009**).

L'attachement du premier glucose au transporteur lipidique est catalysé par une classe particulière d'enzymes. Une glycosyltransférase forme la liaison $\beta(1,4)$ avec le deuxième glucose. Le troisième sucre, un galactose, est lié en $\beta(1,4)$ formant la chaîne centrale de l'unité répétitive. La formation de l'unité pentasaccharide finale nécessite l'action de deux autres glycosyltransférases pour ajout des sucres en embranchement (rhamnose et galactose-1-phosphate). L'assemblage de l'unité répétitive sur un transporteur lipidique est un processus similaire pour la synthèse des EPS excrétés et pour la synthèse du peptidoglycane (**Driider et Prévost, 2009**).

5.2.3. L'exportation et la polymérisation des EPS

Relativement peu de données existent sur les mécanismes de transport des unités répétitives à l'extérieur de la cellule et sur leur polymérisation subséquente.

Chez les bactéries à Gram positif, on retrouve les protéines de transport de type PST pour le transport spécifique des polysaccharides, comportant généralement 12 à 14 séquences transmembranaires (TMS) et une boucle cytoplasmique autour de TMS(Figure5) (**Driider et Prévost, 2009**).

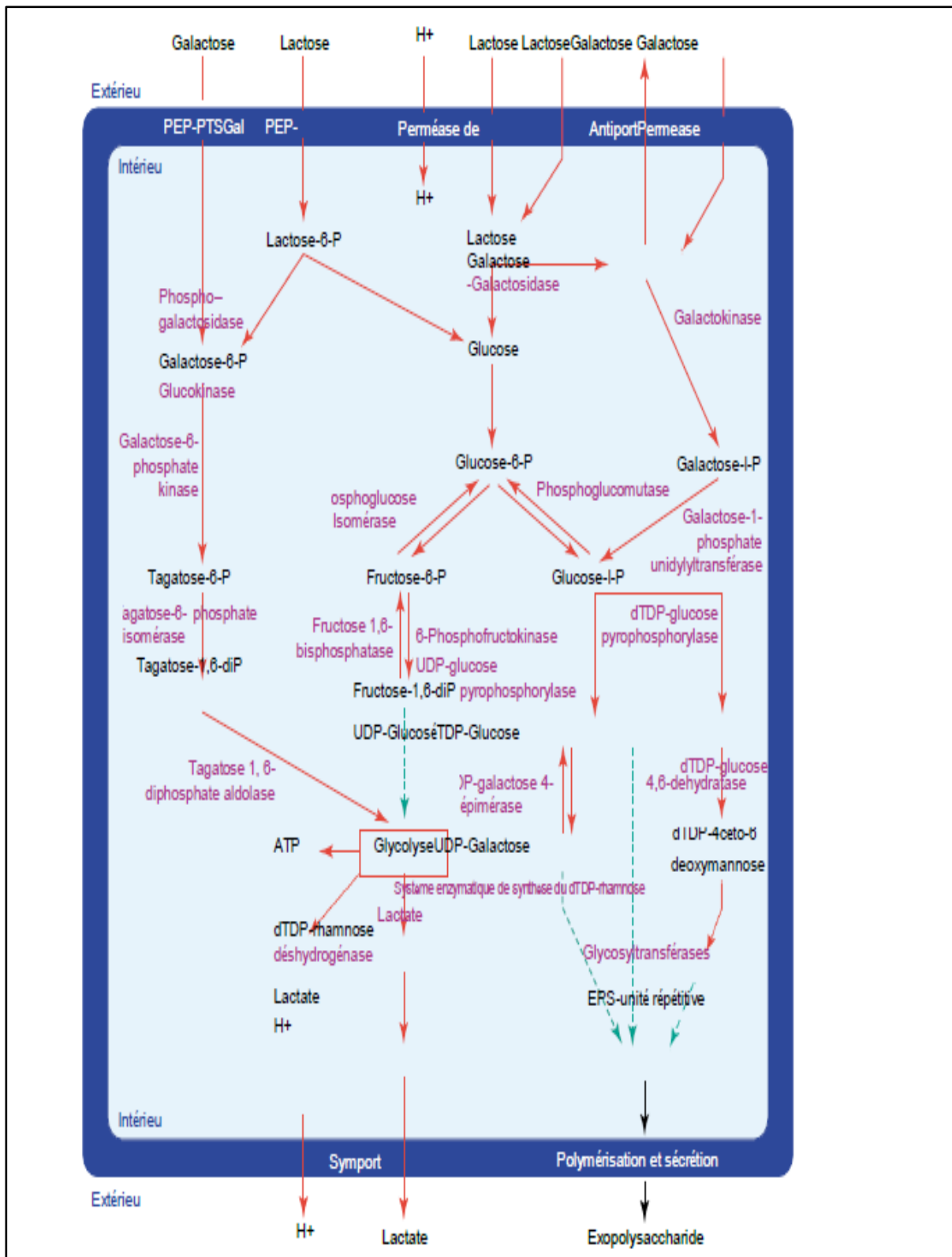


Figure5: Vue globale du métabolisme des sucre et de la biosynthèse des EPS chez les BL(Welman,2003).

6. Application technologique des EPS

Les EPS des BL ont trouvé leur application la plus précieuse dans l'amélioration de la rhéologie, de la texture et de la sensation en bouche des produits laitiers fermentés, tels que les yaourts (**Wlman et al, 2003**).

Il existe une forte demande des consommateurs pour des yaourts onctueux et crémeux, à laquelle on répond généralement en augmentant la teneur en matières grasses, en sucres, en protéines ou en stabilisants (par exemple, pectine, amidon, alginate ou gélatine), la demande des consommateurs pour des produits à faible teneur en graisses ou en sucres et en additifs, ainsi que les facteurs de coût, font des EPS une alternative viable (**Wlman et al, 2003**).

Bien qu'ils n'aient pas de goût propre, les EPS de BL augmentent le temps que le produit laitier passe dans la bouche, ce qui permet d'améliorer la perception du goût (**Wlman et al, 2003**).

Un autre avantage physiologique hypothétique est que les EPS restent plus longtemps dans le tractus gastro-intestinal, ce qui favorise la colonisation par les bactéries probiotiques. En outre, les EPS de BL sont réputés avoir des effets anti tumoraux, une activité immunostimulante, et une réduction du cholestérol sanguin (**Wlman et al, 2003**)(Tableau 4).

Tableau 4: Application technologique des EPS (Patel *et al*, 2012).

Les types	les EPS	les BL	Utilisations
Homopolysaccharide	Dextran	<i>Streptococcus mutans</i>	Support et stabilisateur dans les industries alimentaire et pharmaceutique .
	Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Anticoagulant, industrie du papier, traitement du placage des métaux, pour la récupération assistée du pétrole, biomatériaux.
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Probiotiques, édulcorant dans les confiseries, agent gonflant et extenseur à faible viscosité dans les aliments.
	Levan	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Pro-biotique, propriété anti-tumorale, hypocholestérolémiant, agent, adhésif écologique, bio-épaississant dans l'industrie alimentaire.
<i>Streptococcus mutans</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
	Reuteran	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Utilise dans la boulangerie.
Hétéropolysaccharide	Kefiran	<i>Lactobacillus kefir</i>	Améliore les propriétés visco-élastiques des gels de lait acide.
		<i>Leuconostoc sp.</i>	Les propriétés antimicrobiennes et de cicatrisation.
		<i>Delbrueckii subsp.</i>	Capacité à réduire la pression artérielle et le taux de cholestérol dans le sérum.
			Capacité à retarder la croissance des tumeurs.
			Renforcer l'immunité de l'intestin.

Matériel et

Méthodes

I. Isolement des bactéries lactiques à partir de lait de chèvre et de vache

1. Echantillonnage

Les échantillons de lait de chèvre et de vache utilisés proviennent des régions de Tazougert et de Hamame Laknife situées à l'Ouest de la wilaya de Khenchela (Algérie). Dans notre étude nous avons utilisé trois échantillons (échantillons 1 et 2: lait de chèvre, échantillon 3: lait de vache) (Figure 06) collectés le 28/04/2021.

Le pis de la chèvre et de la vache est lavé à l'eau savonneuse. Rincé avec l'eau javellisée puis séché avec un coton hydrophile stérile. Le jet du lait est ensuite directement recueilli dans des flacons stériles (250mL/flacon).

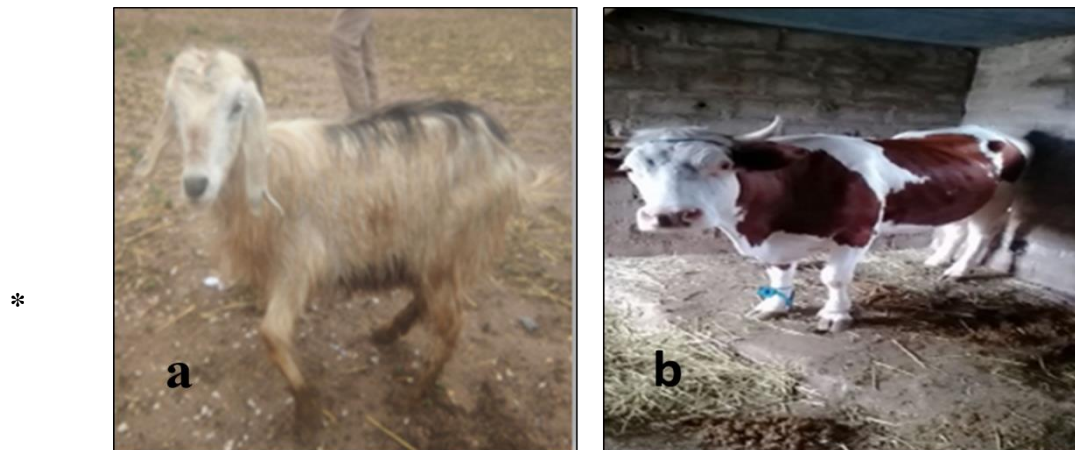


Figure 6:Photos présentant les espèces utilisées dans l'échantillonnage du lait;

a/*Capra argagrus*, b/*Bos taurus* (Zierski et Röhlich, 2013).

2. Mesure de pH

Le pH représente l'acidité du lait à un moment donné. Il a été mesuré à l'aide d'un pH mètre. La valeur du pH caractérisant l'échantillon est lu directement sur l'appareil après immersion de son électrode dans le lait. La mesure de pH est répétée 3 fois avec rinçage de l'électrode avec de l'eau distillée après chaque mesure (Gaddour *et al*, 2013).

3. Isolement des BL productrice d'exopolysaccharides (EPS)

3.1. Préparation des dilutions

Dans un flacon de 250 mL, 90mL d'eau physiologique (0,85 % NaCl) sont mélangées avec 10mL d'échantillons. La solution est ensuite homogénéisée avec un agitateur pendant 30 minutes pour obtenir la 1^{ère} dilution (10^{-1}) à partir de cette dernière une série de dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-5} .

3.2. Pré-enrichissement

Pour l'échantillon 1, la méthode décrite par **Paulo et al(2012)** est utilisée. Un milieu à base de lait écrémé contenant, 0,35% d'extrait de levure (Difco), 0,35% de Peptone (Difco) et 1% de glucose a été utilisé pour favoriser le développement des BL productrices d'EPS. Nous appelons ce milieu «Milieu support de sélection des EPS » (MSE) (Annexes 1).

1mL de chaque dilution, précédemment préparées, est ajouté à des tubes contenant 9mL du milieu d'enrichissement MSE, qui sont ensuite incubées à 30°C pendant 48h. Après incubation, un volume de 0.1mL de chaque tube est étalé par râtaux à la surface de milieux MRSS (10% saccharose) et MRS respectivement, les boîtes sont ensuite incubées à 30°C dans des conditions d'anaérobiose pendant 24h -72h. L'anaérobiose est créée par le biais d'une bougie.

3.3. Etalement direct

Pour les échantillons 2 et 3, 0,1mL de chaque tube de dilutions est directement étalé à la surface des milieux MRS précédemment décrits et dans les mêmes conditions. L'ensemble du protocole d'isolement est illustré dans la figure 7.

4. Purification et identification partielle des isolats lactiques

Les colonies sont sélectionnées selon leur aspect macroscopique et sont choisies aléatoirement. Elles sont ensuite purifiées par repiquage dans un bouillon MRS. Pour l'identification présumptive des BL, des observations macroscopiques et microscopiques à l'état frais, sont réalisées. Seules les cellules non mobiles, Gram positif, catalase négative et ayant des formes caractéristiques des BL (coques ou bacilles), sont retenues pour les analyses ultérieures (**Paulo et al ,2012**).

4.1. Les caractères morphologiques

4.1.1. Examen macroscopique

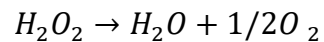
L'examen macroscopique est portée sur l'observation macroscopique qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, taille, pigmentation, viscosité ...).

4.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique a été utilisé pour classer les bactéries selon leur coloration de Gram, leur morphologie, et leur mode d'association (la technique dans annexe 4).

5. Test biochimique

La catalase est une enzyme qui catalyse de dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuse bactérie en H_2O_2 en $1/2 O_2$.



Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame puis à l'aide d'une pipette pasteur boulée puis déposer une colonie isolée de la souche à tester, ensuite observer l'apparition des bulles ou non (Marchal et al, 1991).

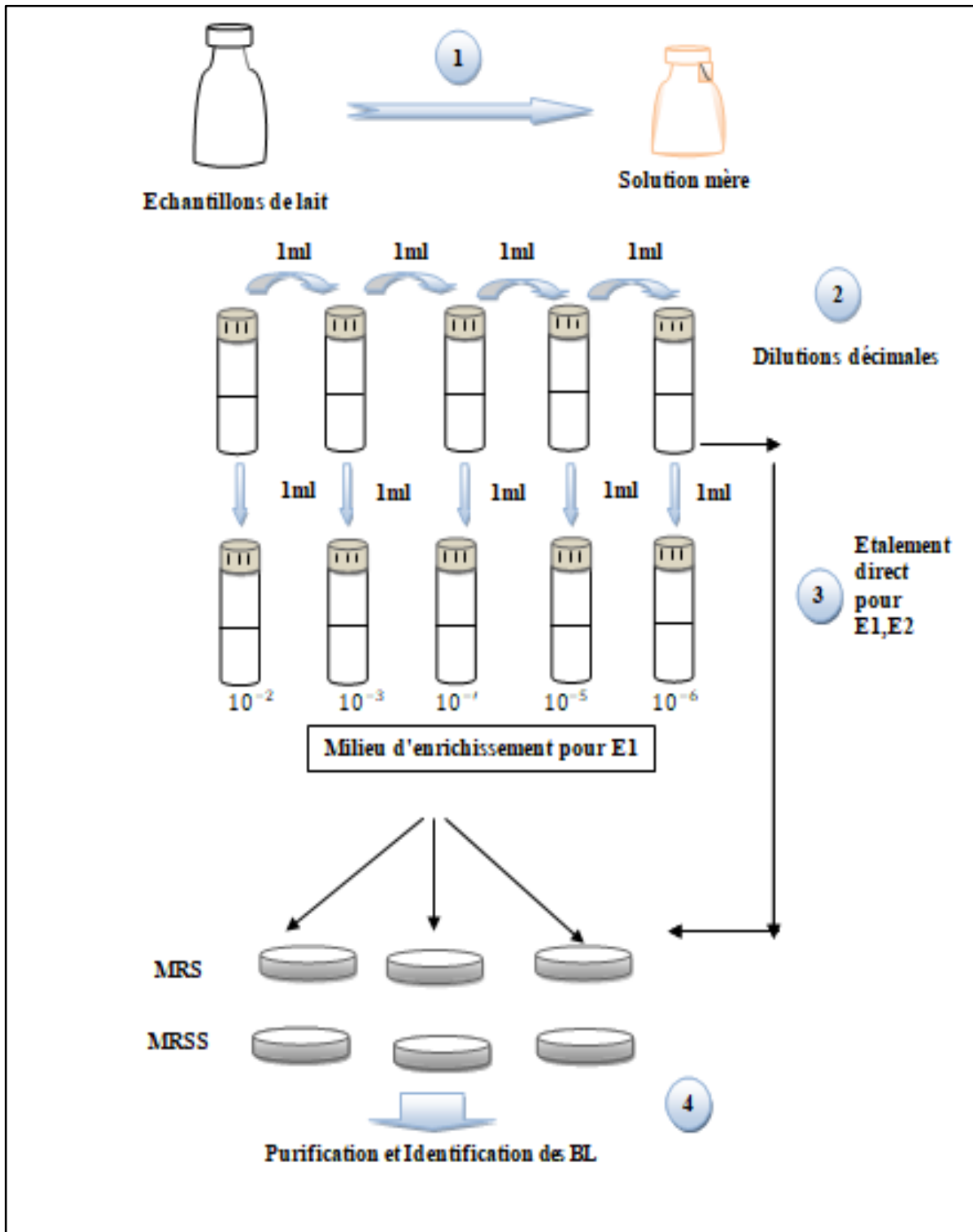


Figure 7: protocole d'isolement des BL productrices des EPS.

6. Criblage des BL pour la production des exopolysaccharides

Pour la mise en évidence de la production des EPS par les isolats sélectionnés, des disques de papier filtre stérile (5 mm Ø) ont été placés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu MRSS. Ils ont été ensuite ensemencés avec 10µL de culture de chaque isolat (Guimarães *et al.*, 1999). Quatre différents isolats ont été testés par boîte de Pétri avec le contrôle négatif (papier filtre ensemencé avec 10µL de bouillon MRS stérile).

Après incubation de 48 à 72h à 30°C, la production d'EPS a été évaluée sur la base de la formation d'une colonie mucoïde autour des disques. La production de ce bio-polymère par les isolats a été confirmée en mélangeant une portion de la substance mucoïde dans 2 ml d'alcool absolu dans des tubes à essai, l'apparition d'une précipité à l'interface révèle la présence des EPS (Paulo *et al.*, 2012).

D'autre part la caractéristique « roupy » est vérifié on testant le phénotype des souches visqueuses productrices de longs filaments visibles par une anse stérile (Figure8).

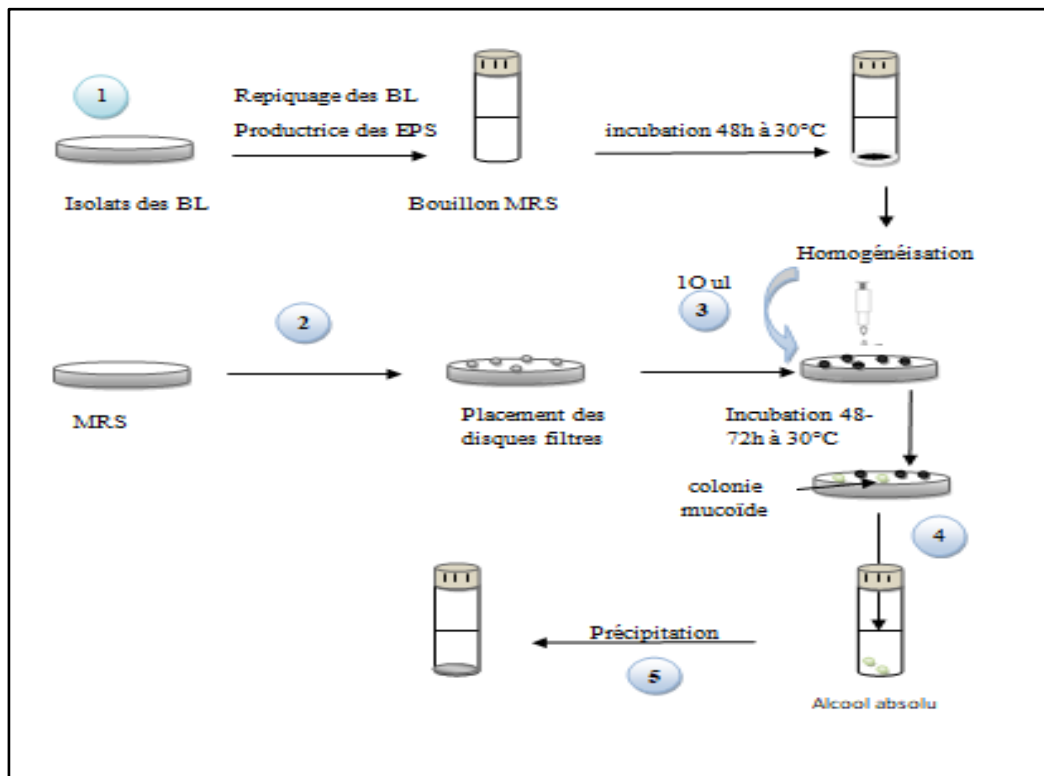


Figure 8: Protocole de criblage des BL pour la production des exopolysaccharides.

7. Etude du pouvoir protéolytique

L'aptitude à la protéolyse de la caséine du lait par les bactéries lactiques est recherchée sur milieu MRS additionné de lait écrémé. La gélose au lait (MRS-ma) a été utilisée pour le

test qualitatif d'activité protéolytique. MRS-ma a été préparé en mélangeant 200ml de lait écrémé stérile avec 800ml de gélose MRS autoclavée (Ph: 6,5) (**Paulo et al, 2012**).

Des disques de papier filtre stérile, préalablement placés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu MRS-ma, sont inoculés avec 10 μ L de culture de chaque isolat, puis incubé à 30°C pendant 24h -48h. L'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

8. Etude de l'activité antimicrobienne

Les isolats lactiques sélectionnés, sont testés pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par des disques, décrite par **Guiraud et Rosec, (2004)**. Elle consiste à déposer des disques de papier filtre stérile imprégnés des souches lactiques en bouillon, à la surface des boites de Pétri préalablement inoculées par les souches bactériennes cibles. L'inhibition se manifeste par la présence de zones claires autour d'un trouble formé par la croissance des souches cibles.

8.1. Les souches bactériennes test

Dans la présente étude 4 souches bactériennes, obtenues auprès de l'American Type Culture Collection(ATCC), ont été utilisées pour tester le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques sélectionnées : *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

À partir d'une culture de 24h sur gélose nutritive, une suspension de chaque bactérie-test est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par addition d'eau physiologique stérile en comparaison avec une solution de Mac Farland 0,5 de façon à obtenir une concentration de 10⁶ UFC/ ml.

8.2. Technique de diffusion sur disque

La gélose de Mueller Hinton (MH) est répartie dans les boites de Pétri puisensemencée en surface, après solidification par la bactérie cible. Les boites sont laissées sécher pendant 5 min, puis les disques filtres de 5mm de diamètre sont déposés aseptiquement, sur cette couche basale du milieu MH. Ces disques sont imprégnés de 10 μ L des cultures de bactéries lactiques à tester. Les boites de pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h. La lecture de l'activité antimicrobienne se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques, exprimée en mm (**Guiraud et Rosec, 2004**).

Résultats et

Discussion

1. Isolements et identifications des bactéries lactiques à partir de lait de chèvre et de vache

Lors de cette étude nous avons isolé et purifié 18 souches des BL à partir de lait de chèvre et de lait de vache.

Tableaux 5: Caractéristiques des échantillons de lait

Type de lait	Ph	Milieu d'isolement	Nombre d'isolats sélectionnés
E1 : Lait de chèvre	6,89	MRS/MRSS	4
E2 : Lait de chèvre	6,72		5
E3 : Lait de vache	7,11		6

1.1. Les caractères macroscopiques

La caractérisation macroscopique a permis de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides MRS et MRSS après 72h d'incubation à 30°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité), et les caractères des colonies (Ghalouni,2019)(Tableau5).

Cette examen nous a permis de visualiser des colonies de taille petite, grande et moyenne, de forme circulaire avec une surface plate et parfois bombée à contours réguliers, de couleur blanchâtre, crème et présentant une texture crémeuse (Figure 9).



Figure9: Exemple des résultats d'isolement des bactéries lactiques sur milieux MRS, MRSS à partir d'échantillon de lait de vache et de lait de chèvre.

1.2. Les caractères microscopiques

La coloration de Gram a montré que tous les isolats sont de Gram positif (Figure10), et le test de catalase était négatif (Figure11). Ces caractéristiques permettent de les considérer, de façons présomptives, comme BL (**Belarbi, 2011**). L'étude microscopique nous a permis de révéler la présence des cellules en forme de cocci disposées en paire ou isolées, en chaînettes et par fois en amas (Tableau 6).

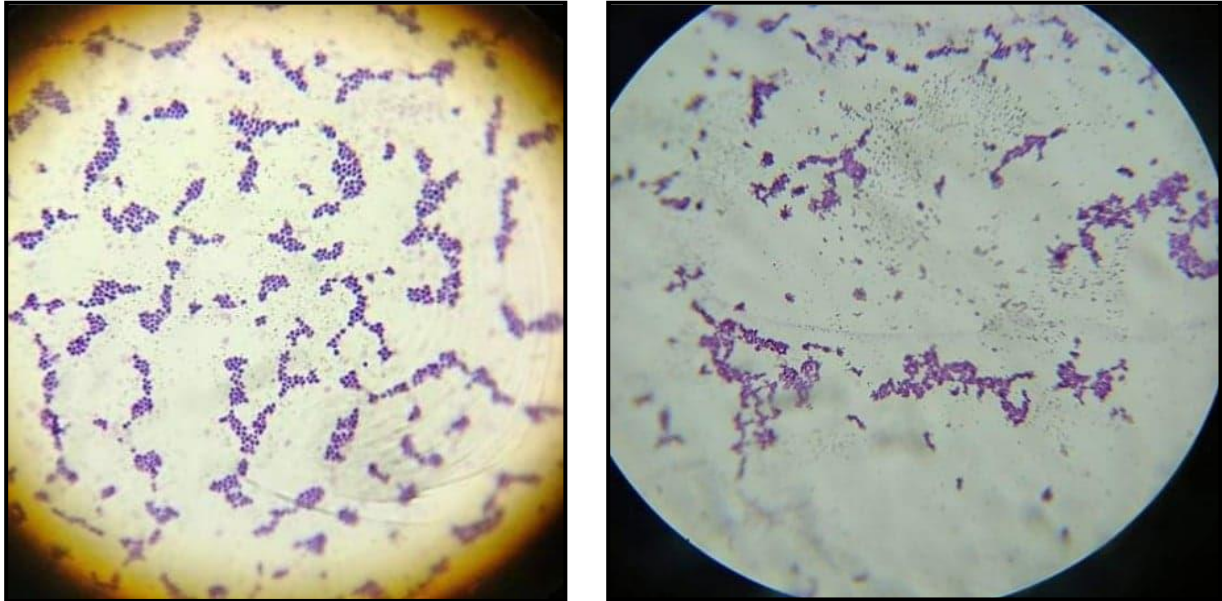


Figure10 : Exemple de résultats de coloration de Gram de quelque isolat (G× 100).

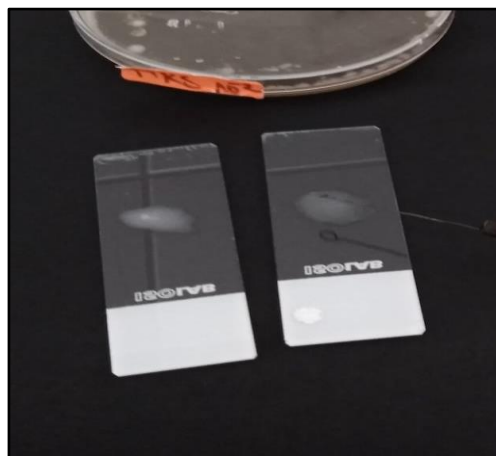


Figure11: Exemple de résultats de test de catalase.

Tableau 6:Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats sélectionnés et purifiés.

Isolats	Caractéristique macroscopique				Caractéristique microscopique		Teste biochimique
	Origine	Ph	Aspect de la couleur de la colonie	Aspect de la culture en bouillon	Gram	Forme de la cellule	Catalase
BL1	E1: lait de chèvre	6,89	Blanche, grande , crémeuse	Culot moyen	+	Coque	-
BL2			Blanche, grande , crémeuse	Petit culot, trouble claire	+	Coque	-
BL3			Blanche, petite bombé	Petit culot	+	Coque	-
BL4			Blanche, plate	Culot moyen , trouble claire	+	Coque	-
BL5	E2: lait de chèvre	6,72	Blanche, petite, crémeuse	Culot moyen	+	Coque	-
BL6			Blanche, bombé, crémeuse	Petit culot	+	Coque	-
BL7			Blanche, petite, plat	Petit culot	+	Coque	-
BL8			Blanche, petite , plate	Culot moyen	+	Coque	-
BL9			Blanche, moyenne, bombée	Petit culot	+	Coque	-
BL10	E3: lait de vache	7,11	Blanche, crémeuse, bombée	Culot moyen	+	Coque	-
BL11			Blanche, plate, petite	Petit culot	+	Coque	-
BL12			Blanche, petite, crémeuse	Petit culot	+	Coque	-
BL13			Blanche, petite, bombée	Petit culot	+	Coque	-
BL14			Blanche, petite, plate	Petit culot	+	Coque	-
BL15			Blanche, petite, plate	Culot moyen	+	Coque	-
BL16			Blanche, petite	Culot moyen	+	Coque	-
BL17			Blanche, moyenne, crémeuse	Petit culot	+	Coque	-
BL18			Blanche, moyenne, bombée	Petit culot	+	Coque	-

(+) Résultats positifs

(-) Résultats négatifs

Notre présente étude a permis d'isoler, de caractériser 18 souches de bactéries lactiques en forme de cocci. Aucune différence majeure n'a été observée quant à la distribution des isolats dans les trois échantillons du lait. Ces résultats sont compatibles avec les résultats décrits dans les travaux de **Saidi *et al*, (2002)** ; **Badis *et al*, (2004)** ; **karam *et Karam*, (2006)** ; **Lairini *et al*,(2014)** ; **Zantar *et al*, (2014)** sur le lait cru de chèvre, le lait de chamelle et les produits laitiers traditionnels.

2. Criblage des bactéries lactiques pour la production des exopolysaccharides

Le tableau 7 montre les résultats de criblage des bactéries lactiques sur milieux MRSS après incubation de 48h. La présence d'EPS associés aux cellules bactériennes est reconnue par la formation de colonies dans un milieu solide. Les souches productrices des EPS forment des colonies brillantes, bombées et visqueuses, on dit alors qu'elles ont un phénotype mucoïde. L'une des caractéristiques de phénotype de la production des EPS est que lorsque l'on touche et étire la colonie avec l'anse de platine, celle-ci forme un long filment (Figure12), cependant cette expérience n'est pas toujours fiable, certaines souches ne synthétisent pas d'EPS sur un milieu solide (**Paulo *et al*, 2012**).

La production de polymères a été confirmée en mélangeant chaque colonie mucoïde dans l'éthanol d'une part et en mélangeant l'isolat de bactéries lactiques dans l'éthanol d'autre part. La formation d'un précipité et d'une suspension opaque respectivement, a indiqué la présence d'EPS (**Paulo *et al*, 2012**)(Figure 13).

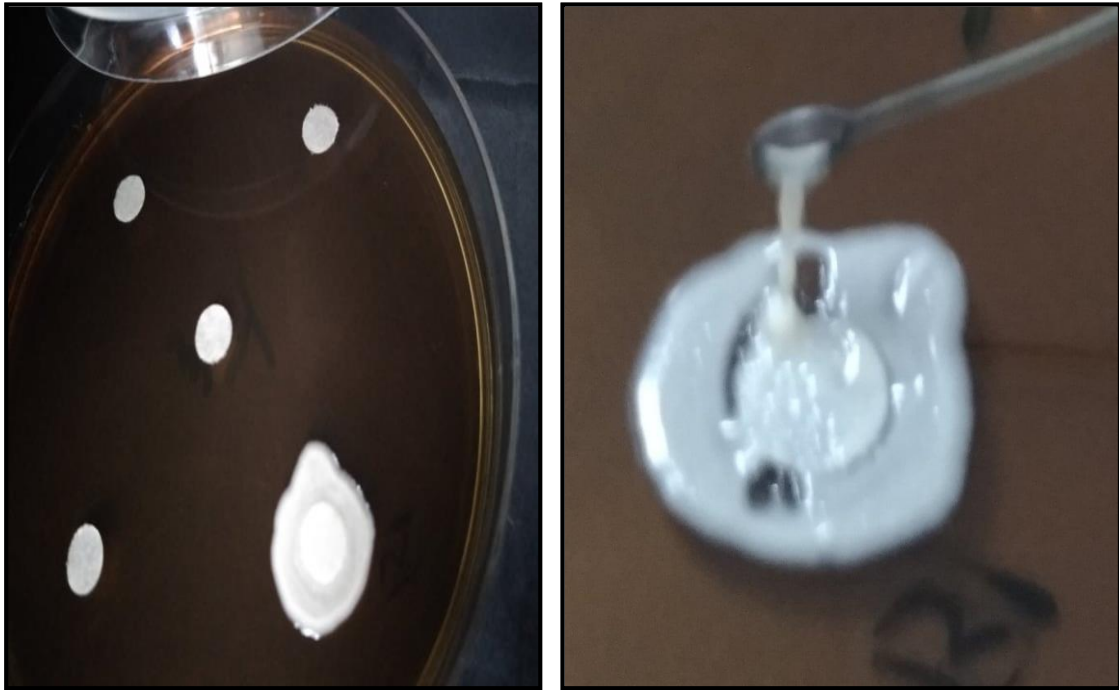


Figure 12: Photos de colonie mucoïde à gauche; colonie bactérienne ayant un aspect mucoïde, à droite ; filament formé au contact d'une anse de platine avec une colonie bactérienne mucoïde.

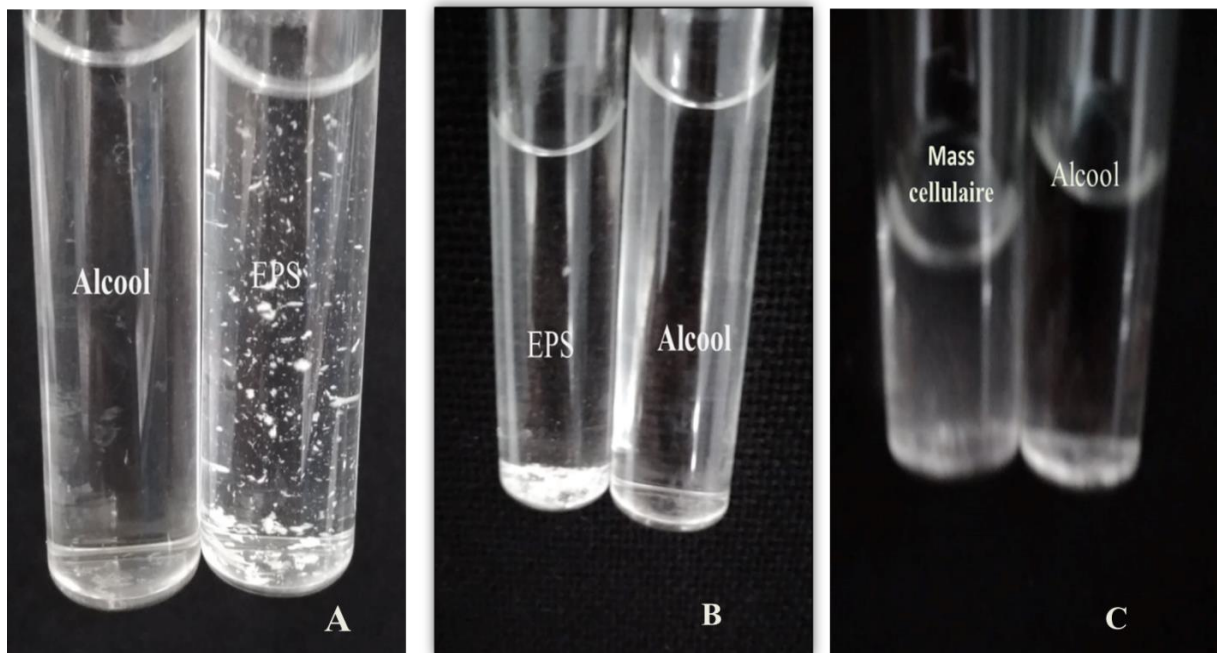


Figure13 : Confirmation de la production d'EPS par le mélange des colonies mucoïdes. A et B ; précipitation des EPS (sécrétions autour des colonies) au contact de l'alcool, C ; la suspension cellulaire opaque dans l'alcool absolu.

Parmi les 18 souches de BL isolées 10 souches ont donné des résultats positifs pour la production d'EPS. Ces résultats montrent que la production d'EPS varie d'une souche à l'autre. Cependant, certains types de sucres sont meilleurs pour la production d'EPS car la production du polymère dépend de la souche testée et donc du métabolisme enzymatique de chaque souche. Ces résultats sont en accord avec les résultats décrits dans les travaux de **Savado** *et al.*, (2001)(Tableau7).

Les souches productrices d'EPS possèdent des colonies de taille larges visqueuses sous forme gluantes d'aspect semi-liquide qui ressemblent au phénotype décrit par **Paulo et al.**, (2012). Nos résultats révèlent que les coques testés présentent le caractère mucoïde luisant filant. Selon **Drider et Prévost**, (2009), le caractère filant présent généralement chez les souches qui produisent les capsules polysaccharidiques *S.thermophilus*, *Lb.bulgaricus* se distinguent par la formation de fils visqueux.

Au sein des isolats issus du même échantillon les résultats peuvent être différents. En effet **Zidane**, (2016) a pu identifier des souches productrices d'EPS et des souches non productrices sans que ce caractère n'engendre des disparités de croissance.

Dans cette étude, l'environnement idéal pour la production d'EPS par les isolats de BL s'est avéré être un milieu basique complété par du saccharose à pH 7,5 et une température de 30°C.

De nombreuses bactéries synthétisent le saccharose et le dextran, un polymère extracellulaire, par l'action de l'enzyme dextran-saccharose comme source prédominante d'hydrates de carbone. Le principal producteur est le genre bactérien *Leuconostoc*. Ce milieu gélosé MRSS permettent une sélection préliminaire des souches pouvant produire des EPS. Le saccharose permet la plus grande production de biopolymères chez la plupart des BL (**Paulo et al.**, 2012).Le rendement total des EPS produits par les BL dépend de la composition du milieu, de la souche de BL et des conditions de croissance comme la température, le pH, la tension d'oxygène et la période d'incubation (**Patel et al.**, 2011).

3. Etude du pouvoir protéolytique

Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont importants, en tant que des moyens qui rendent la protéine disponibles pour la croissance et essentiellement, en tant qu'élément de traitement dans les procédés de maturation qui donnent aux aliments leurs propriétés rhéologiques et caractéristiques organoleptiques (**Bouton et al.**, 1993).

Les résultats de la protéolyse réalisée sur milieux MRS additionnés du lait écrémé

pour les différents isolats ne révèlent aucunes activités protéolytiques présentes chez souches traduites par l'absence d'un halo claire autour des disques (Tableau 7).

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité à produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels pour la croissance. Il est connu que le système protéolytique des BL dégrade les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (**EL-Ghaih et al, 2011**).

Selon **Idoui et Karam, (2008); Zantar et al, (2014)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15mm par comparaison à cette donnée, nos souches ne possèdent pas l'activité protéolytique. Ces résultats montrent que, probablement, l'activité protéolytique dépend des souches, et qu'il existe une relation entre la composition du milieu de croissance et l'expression de l'activité protéolytiques (**Zantar et al, 2014**).

4. Etude de l'activité antimicrobienne

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques sont dérivées de la concurrence pour les nutriments et la production d'un ou de plusieurs métabolites antimicrobiens actifs tels que les acides organiques (acide lactiques, acides acétiques), le peroxyde d'hydrogène et autres composants tels que les bactériocines et les peptides antifongiques (**Bouzaid et al, 2016**).

Dans le présent travail, la révélation du spectre d'activité antibactérienne des isolats de bactéries lactiques a été réalisée contre des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300).

La méthode de diffusion en disque a été utilisée pour la détection des inhibitions, cependant les résultats de l'activité antimicrobienne réalisée sur milieux MH n'ont révélé aucune activité antimicrobienne des isolats testés.

La capacité antagoniste des BL contre les bactéries à potentiel pathogène, en particulier les bactéries présentes dans l'environnement des produits laitiers, est une caractéristique très recherchée et une caractéristique clé dans la conservation biologique des aliments (**Fleming et al, 1985**).

Dans notre étude aucune inhibition n'a été observée contre les souches pathogène .Ces résultats sont pas en accords avec les travaux de nombreux auteurs ayant décrit le pouvoir antimicrobien exercé par nombreuses BL isolées de produits laitiers et autres matrices alimentaires(Léonard, 2013 ;Mami, 2013 ;Bouzaid *et al*, 2016).Selon, la littérature les BL des produits laitiers sont connues pour la production de métabolites antimicrobiens contrairement à ce que nous avons obtenu (Allouche *et al*, 2010 ;Dib *et al* ,2012; Bouzaid *et al*, 2016).Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, les BL sélectionnées ne possèdent pas d' activité antimicrobienne contre les souches testées ou ces dernières sont résistantes (Tableau 7).

Tableau 7: Résumé de résultats de criblage des BL pour la production des EPS, des activités protéolytiques et l'activité antimicrobiennes.

Isolats	Origine	Teste des EPS	Activité protéolytique	Activité antimicrobienne
BL1	E1:lait de chèvre	-	-	-
BL2		+	-	-
BL3		++	-	-
BL4		-	-	-
BL5	E2:lait de chèvre	-	-	-
BL6		-	-	-
BL7		-	-	-
BL8		+	-	-
BL9		+++	-	-
BL10	E3: lait de vache	+	-	-
BL11		+	-	-
BL12		++	-	-
BL13		-	-	-
BL14		-	-	-
BL15		+++	-	-
BL16		+	-	-
BL17		-	-	-
BL18		+	-	-

(+++) **Fortement productrice, (++) Production moyenne, (+) Basse production,**

(-) Non productrice.

Conclusion et

Perspectives

Les exopolysaccharides (EPS) produite naturellement par certaines bactéries lactiques (BL) suscitent un intérêt technologique du à leur capacité de rétention d'eau et celle de moduler la viscosité des produits fermentés. Des rapports récents ont révélé l'énorme potentiel des EPS dérivés de BL dans les industries alimentaire, pharmaceutique et médicale.

La présente étude a permis d'isoler et identifier, partiellement, des BL à partir des laits de vache et de chèvre issus de la région de Khenchela.

Il ressort de cette étude que les échantillons de lait de chèvre et de lait de vache contiennent des bactéries lactiques productrices d'EPS. La production a été possible sur le lait et aussi sur milieux synthétique (MRSS) utilisé à cet effet. Le test de confirmation a permis une confirmation de la production d'EPS, en se basant sur la précipitation à l'éthanol ainsi que la sélection préliminaire des souches fortement productrices.

Les tests de l'isolement et de l'identification aux quels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 18 souches lactiques, avec 10 souches présentant le pouvoir de produire des EPS.

Dans le présent travail, les isolats lactiques ont été testée contre des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300), et des activités protéolytiques ont été recherchées, mais sans succès.

L'ensemble des résultats obtenus nous ouvrent aux perspectives suivantes :

- ❖ l'identification moléculaire des isolats ayants manifestés la production des EPS;
- ❖ la confirmation de la production d'EPS, par des dosages spectrophotométriques;
- ❖ la détermination de la structure des EPS sécrétés et la caractérisation de leurs propriétés.

Références

Bibliographiques

A

- **Alexander,H, Grandvalel,C, Guilloux-benatier, M, Remize-barnavn,F, Tourdot-marechal,R,(2008).** *Les bactéries lactiques en œnologie.* Paris .Lavoisier, 30-99.
- **Allouche, F, N, Hellal, A, Laraba, A, (2010).** *Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière.* *Revue Nature et Technologies*, 2(2):13-20.
- **Astier-Théfennea,H, Wolfa,A, Darlesa,C, Garnotela, E ,(2014).** *Vérification des performances d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram.* *Revue francophone des laboratoires* ,461(10):37-46.

B

- **Badis, A, Guetarni,D, Boudjema, B,M, Henni,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(5):579-588.
- **Badis, A, Laouabdia-Sellami, N, Guetarni, D, Kihal, M, Ouzrout, R. ,(2005).** *Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales" Arabica et Kabyle". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.
- **Balarbi, F, (2011).** *Isolement et sélection des bactéries lactiques productrices des métabolites antimicrobiennes .mémoire de magister présenté pour option le diplôme en microbiologies alimentaires et industrielles. Université d'Oran Es Senia*, p 4.
- **Bousseboua,H, (2002).** *Microbiologie générale .Algérie .université mentouri Constantine*, p 147-149.
- **Bouton, Y, Guyot, P, Dasen, A, Grappin, R,(1993)** *Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de comité. I. Validation sur mini fromages des techniques de laboratoire. Le lait, Inra editions*, 73(3): 265-279.
- **Bouzaid, M., Chatoui,R., L'attache,R., et Hasib,A, (2016).** *Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc).* *Microbial. Ind. San et Environn*, 10(1): 1-12.

C

- **Carine, D, Philippe, T** ,(2009). *Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaire* 13,143,154.
- **Clothilde, B**, (2014). *Etude de la synthèse des exopolysaccharides sécrétée par les mycoplasmes du groupe mycoides et notamment par Mycoplasma mycoides subsp mycoides agent de la péripneumoie contagieuse bovine. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat. France. Université de Lyon1. p53.*

D

- **Deriossart, H-B**,(1986).*Les bactérie lactique .in lait et produits laitiers? vol.3.technique et documentaion lavoisier. Paris. P343-407.*
- **Dib, H, Hajj Semaan, E, Mrad, R, Ayoub, J, Choueiry, L, Moussa, H, Bitar, G** ,(2012).*Identification et évaluation de l'effet probiotiques des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. Le banese Science Journal, 13(1): 43-48.*
- **Drider,D, Prévost,H**,(2009). *Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme. génomique et applications industrielles .Paris. Economica. p509.*

E

- **El- Ghaish, S, Ahmadova, A, Hadji-Sfaxi, I, El Mechrefi , K.E, et Bazukyane, I**,(2011). *Potentials use of lactic acide bacteria for réduction of eduction of allergenicity ans for longer conservation of. fermented foods. Tré food Sci technol, 1- 8.*
- **El Hachemi, S**, (2019). *Étude de la variation saisonnière des paramètres biochimiques et microbiologiques du lait cru de vache à la traite dans l'Ouest Algérien. Présenté pour l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle LMD. Mostganem. Université Abdelhamid Ibn Badis. p4.*

F

- **Fanica,P-O, (2002).** *Le lait, la vache et la citadin, France, Quae .p41.*
- **Fleming,H, R, Etmell, G, L, et Costilow, R,N, (1985).** *Microbial inhibition by isolate of pediococcus form cucumber brune. Appl ans Microbiologie, 30 :104- 1042.*

G

- **Gaddour, A, Najari, S, Abdennebi, M , Arroum, S, Assadi, M ,(2013).** *Caractérisation physicochimique du lait de chèvre et de vache collectée localement dans les régions arides de la Tunisie. Options Méditerranéennes, Ano, 151-154.*
- **Ghalouni, E,(2019).** *Modélisation mathématique de quelques activités a intérêts technologiques chez des bactéries lactiques isolées de lait fermenté "l'ben" Algérien. thèse de doctorat présenté pour option le diplôme en écosystèmes microbiennes complexes .Oran .Université Oran 1-ahmed ben Bella, p 11-14.*
- **Guirau,J-P,(2012).** *Microbiologie alimentaire. Paris. Dunod. p 75-136.*
- **Guiraud,J et Gaizey,P,(1980).** *.Analyse microbiologique dans les industries alimentaire .Ed . Lusine nouvelle. Paris.p236.*
- **Guiraud,J-P., Rosec,J-P. (2004).** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire. France .afnor, p237-243.*

I

- **Idoui, T, et Karam, N, E, (2008).** *Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. Grasas y Aceites, 59(4): 361-367.*

J

- **Joffin,J-N,(2010)** .*Microbiologie alimentaire. cours alsace-lorraine. centre régionale de documentation .N°6. p137.*

K

- **Karam, H, Z, et Karam, N, E, (2006).** *Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de lactococcus résistantes au sel. Tropicultura, 24(3): 153-156.*
- **Kont, M, (1999).** *Le lait et le produit laitier. Sénégal. Université de Nouakchott, p4.*
- **Korcz, E, varga,L,(2021).** *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. Journal homepage: Elsevier.10:375-384.*

L

- **Lairini,S, Beqqali,N, Bouslamti,R, Belkhou,R, et Zerrouq,F (2014).** *Isolément des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels marocains et formulation d'un lait fermenté proche du kéfir. Afrique science. Revue international des sciences et technologie, 10(4):267-277.*
- **Léonard,L, (2013).** *Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Autre. Université de Bourgogne. Français. P 215.*
- **Li,L, Han,N,S, (2018).** *Application of lactic acid bacteria for food biotechnology.Emerging areas in bioengineering. 2:375-398.*
- **Lupien.J,(1995)** . *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Italie. FAO. N°28 :p 42- 43- 229.*

M

- **Mami,A ,(2013).** *Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse présenté pour l'obtention de diplôme de doctorat en microbiologie. Oran. Université'Oran. p53.*
- **Marchal,N, Bourdon,J-L , Richard,C-L,(1991).** *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème}Ed . Doin éditeurs .Paris .*
- **Mora-Villalobos, J, A, Montero-Zamora, J, Barboza, N, Rojas-Garbanzo, C, Usaga, J, Redondo-Solano, M,et Lopez-Gomez, J, P,(2020).** *Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. Fermentation, 6(1):23.*

P

- **Patel ,S, Majumder, A, Goyal, A, (2012).** *Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Indian journal of microbiology, 52(1): 3-12.*
- **Paulo, E, M, Vasconcelos, M, P, Oliveira, I,S, Affe, H,M,D,J, Nascimento, R., Melo, I, S, D , et Assis, S,A, D, (2012).** *An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. Food Science and Technology, 32(4):710-714.*

R

- **Rohrmann,C,(2013)** *.Evaluation de la consommation de lait de produits laitiers et de produits de substitution du lait dans une patientèle de médecine générale Les recommandations du Programme National Nutrition Santé sont-elles suivies ?. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine .Franc . Université du droit et de la santé – lille 2 .p 31.*
- **Ruas-Madiedo.P, De Los Reyes-Gavilán, C, G, (2005).** *Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal of dairy science, 88(3): 843-856.*

S

- **Saidi,N , Guessas,B , Bensalah,F , Badis,A , Hadadji, , Henni, EPrevast, H et Kihal,M, (2002).** *Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. Journal Algerian des regions arides, 1(1): 01-10.*
- **Salminen,S , wright,A-V ,et Ouwehand,A,(2004).** *Lactic acid bacteria. microbiological and functional. Aspects new York .marcel deker , p15.*
- **Savadogo, A, Quattara, C,A,T, Ouattara, A,S, et Traoré.\$, (2001).** *Isolement et caractérisation de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides à partir de lait du Burkina Faso. Revue sci. Et tech, Séries sci.Nat. et Agro, 25, 75-85.*
- **Savadogo,A, Traore, A, S, (2011).** *La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés.International Journal of Biological and Chemical Sciences, 5(5):2057-2075.*

V

- **Viginola,C-L,(2002).** *Science et technologie du lait . transformation du lait. école technique de montériale, p30-34.*
- **Vilain, A,C, (2010).** *Qu'est-ce que le lait?. Revue française d'allergologie, 50(3): 124-127.*
- **Vuyst,L, Degeest,B, (1999).** *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews, 23(2): 153-177.*

W

- **Wehrmüller,K, Ryffel,S,(2007).** *Produits au lait de chèvre et alimentation. agroscope lebefeld-posieux ,28(4):1-5.*
- **Welman ,A. D, Maddox, I, S, (2003).** *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in biotechnology, 21(6): 269-274.*

Y

- **Yu,A, O, Leveau, J, H, et Marco, M, L, (2020).** *Abundance, diversity and plant specific adaptations of plant associated lactic acid bacteria. Environmental Microbiology Reports, 12(1): 16-29.*

Z

- **Zantar,S, El Galiou,O, Zerrouk, H, M, et Laglaoui, A, (2014).** *Elaboration d'un fromage de chèvre semi-affiné à partir d'une sélection de souches lactiques autochtones isolées du lait du nord du Maroc,191-197.*
- **Zidani, H,(2015).***Les exopolysaccharides des bactéries lactiques:optimisation et cinétique de production . Mémoire de magister pour l'option de diplôme en microbiologies fondamentale et appliquée .Oran, universités Ahmed Ben Bella, p 73.*
- **Zierski, M,P, Röhlich,P,(2013).***La grande encyclopédie des animaux. Paris, terreséditions, p 175-315.*

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisées**MRS (de Man Rogosa et Sharpe ., 1960)**

Polypeptone.....	10g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique de levure	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse.....	0,05g
Agar agar bactériologique.....	15g
Eau distillé	1L
pH =6,5	

MRSS

Polypeptone.....	10g
Extrait de viande	10g
Extrait autolytique de levure	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1,08g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse.....	0,05g
Agar agar bactériologique.....	15g
Saccharose	100g
Eau distillé	1L
pH=6,5	

MRS additionné de lait écrémé

MRS agar	800mL
----------------	-------

Lait écrémé	200mL
MSE	
Extrait de levure.....	3,5
Peptone	3,5g
Glucose	10g
Lait écrémé	1L
MRS –Bouillon	
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80.....	1g
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sufate de magnédiumheptahydraté	0,2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g
pH =6,2	
Milieu gélose nutritive	
Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Agar.....	14g
Eau distillé	1L
pH = 7,4	
Gélose Muller Hinton	
Extrait de viande	3g
Hudrolysat acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	16g
Eau distillée	1L
pH=7,3	

Eau physiologie

Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillé	1L

Remarque : autoclavage 30min /121°C à toutes les milieux

Annex 2: Compositions des colorants**Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane.....	10g
Phénol.....	20g
Ethanol à 0,95.....	100g
Eau distillée.....	1L

Lugol

Iode.....	5g
Io dure de potassium	10g
Eau distillée.....	1g

Fuchsine de ziehlfuchine

Bosique	10g
Phénol.....	50g
Ethanol à 0,5	10 cm ³
Eau distillée	1dm ³

Annex 3: La méthode à la bougie (anaérobiose)

Pour la méthode à la bougie: une anaérobiose enrichie en CO₂ peut être facilement réalisée en utilisant un récipient fermé dans lequel on place une bougie allumée à côté des boîtes de Pétri. Le récipient est fermé et la bougie s'éteint au bout de quelques instants ayant consommé de l'oxygène et libéré du gaz carbonique (Wei-tselan et al.,2009).



Annexe 4 : Coloration de Gram

- ✓ **Coloration de Gram**
- ✓ **L'états frais**

Mettre une goutte de l'eau distillés a l'aide d'un pipette au centre d'une lame , avec un anse de platine prendre une petite partie d'une colonie isolée ,la déposer à côté de la goutte pour la visualiser et mélanger avec l'eau ,faire sécher complètement sur la plaque chauffante

- ✓ **Technique de la coloration**
 - Un frottis fixé et coloré au violet de cristal pendant 1min.
 - Rincer rapidement à l'eau distillée.
 - Couvrir par une solution de l'iode pendant 1min.
 - Rincer rapidement à l'eau distillé.
 - Rincer le frottis avec mélange de alcool-acétone pendant 30s.
 - Rincer rapidement à l'eau distillé.
 - Couvrir avec le safranine pendant 1min.
 - Rincer rapidement avec l'eau distille.

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à fort grossissement($G \times 100$)(*Bousseboua, H, 2002*), (*Astier-Théfenne et al, 2014*)).

La lecture

Gram positif +: violet(fixent pas le cristal).

Gram négatif -: rose(ne fixe pas le cristal)