

Table des matières

Dédicaces	i
Remerciements	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
1 Introduction Générale	1
2 Recherche Bibliographique	3
2.1 Élevage	4
2.1.1 Ovins	4
2.1.2 Caprins	5
2.1.3 Bovins	6
2.1.4 Camelins	7
2.2 Le lait	7
2.2.1 Historique	7
2.2.2 Variation de la composition du lait	8
2.2.3 Valeur alimentaire du lait	8
2.2.4 Le lait, excellente source de protéines et de calcium	9
2.2.5 Le lait, source de protéines	9
2.2.6 Le lait source de calcium	9
2.2.7 Animaux et systèmes de production du lait	10
2.2.7.1 L’homme	10
2.2.7.2 L’animal	10
2.2.7.3 Le milieu	10
2.3 Le Yaourt	11

2.3.1	Définition	11
2.3.1.1	Fabrication de yaourt	11
2.3.1.2	Matière première	11
2.3.2	Préparation et standardisation du mélange laitier	13
2.3.2.1	Homogénéisation et traitement thermique du lait	14
2.3.2.2	Inoculation, fermentation et conditionnement	15
2.3.2.3	Refroidissement et transport	18
2.4	Les bactéries lactiques	18
2.4.1	Généralités	18
2.4.1.1	Le genre <i>Lactobacillus</i>	20
2.4.1.2	Groupe <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	21
2.4.1.3	Le genre <i>Enterococcus</i>	21
2.4.1.4	Le genre <i>Streptococcus thermophilus</i>	22
2.5	Bactéries pathogènes	22
2.5.1	<i>Helicobacter pylori</i>	22
2.5.2	<i>Salmonella spp</i>	25
2.6	Identification de LAB	27
2.6.1	Caractérisation phénotypique de LAB	27
2.6.1.1	Caractères biochimiques	28
2.7	Caractérisation génotypique de LAB	28
2.7.1	La PCR	28
2.7.1.1	Le Principe	28
2.7.1.2	Hybridation de l'ADN	29
2.7.1.3	Le gènes 16S/23S d'ARNr	29
2.7.1.4	Séquençage du gène de ménage	30
2.8	Les techniques basées sur la PCR	30
2.8.1	Amplified Polymorphism analyse (AFLP)	30
2.8.2	La restriction de l'ADN amplifié par une enzyme de restriction (RFLP)	31
2.8.3	Amplification d'ADN par des amorces aléatoires, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)	31
2.8.4	REP (Répétitif extragénique palindromique), ERIC-PCR, GTG5- PCR, Box-PCR	32
2.9	Les probiotiques	32
2.9.1	Définition	32
2.9.2	L'effet bénéfique pour la santé	33
2.9.3	Effets Nutritionnels	34

2.9.4	Immunomodulation	35
2.9.5	Effets Thérapeutiques	35
2.10	Critères de sélection des LAB probiotiques.	36
2.11	Sécurité d'utilisation	36
2.12	Critères fonctionnels	37
2.12.1	Résistance au transit gastro-intestinal	37
2.12.2	Survie dans le site d'action	37
2.12.3	Critères Technologiques	38
2.13	Les bactériocines	38
2.13.1	Définition	38
2.13.2	Nomenclature	39
2.13.3	Classes bactériocines	40
2.13.4	Présence des bactériocines	40
2.13.5	Mode d'action des bactériocines	41
2.13.6	Production et la purification des bactériocines	43
2.14	Exopolysaccharides de LAB	44
2.14.1	Définition de EPS	44
2.14.2	Caractéristiques et Classification de EPS	44
2.14.3	Synthèse d'EPS	45
2.14.4	Rôle physiologique de la production d'EPS	45
2.14.5	Biosynthèse d'EPS	46
2.14.6	Structure moléculaire d'EPS	47
3	Matériels et Méthodes	48
3.1	Objectifs	49
3.2	Prélèvement des échantillons	50
3.2.1	Le lieu de travail	50
3.2.2	Préparation des échantillons	50
3.2.3	Isolement et purification des souches bactériennes	51
3.2.4	Les Conditions de culture et de conservation	51
3.2.5	Les Milieux de culture	51
3.2.6	Condition de conservation	53
3.2.7	Caractérisation phénotypique des isolats	53
3.2.7.1	Étude macroscopique	53
3.2.7.2	Étude microscopique	53
3.2.7.3	Étude physiologique et biochimique des isolats	53
3.2.7.4	Test Catalase	53

3.2.7.5	Test de type fermentaire	54
3.2.7.6	Test de croissance à 10°C et à 45°C	54
3.2.7.7	Test de croissance aux milieux hostile	54
3.2.7.8	Bouillon hyper salé (2.5 % ; 4 % ; 6.5%)	54
3.2.7.9	Test de lait de sherman	54
3.2.7.10	Test de croissance à milieu hyperalcalin	54
3.2.7.11	Test de Thermorésistance	55
3.2.7.12	Test d'esculine	55
3.2.7.13	Test de fermentations des sucres	55
3.2.8	Identification bactérienne en utilisant les Galerie API	56
3.2.8.1	API20 strep	56
3.2.8.2	Préparation de l'inoculum	56
3.2.8.3	API50 CHL	56
3.2.8.4	Préparation de l'inoculum	57
3.3	Identification génotypiques des isolats	60
3.3.1	Extraction d'ADN Total par l' instagene BioRad	60
3.3.1.1	Amplification d'ADN par méthode de rep-PCR (GTG) ₅ :	62
3.3.1.2	Electrophorèse sur le gel Agarose 1 ,5%	63
3.3.1.3	Amplification et Séquençage de 16S rRNA gène	63
3.3.1.4	Traitement des séquences de l'ADN amplifié	64
3.4	Phylogénie moléculaire du gène 16S rDNA des souches isolées	67
3.5	Les Aptitudes technologiques des isolats	68
3.5.1	Le pouvoir acidifiant	68
3.5.2	L'activité protéolytique	68
3.5.3	L'activité antagonisme	68
3.5.4	Production EPS	69
3.5.5	Production de diacétyle	71
3.5.6	Thermorsitance	71
3.6	Evaluation des propriétés probiotiques	71
3.6.1	Simulation de la tolérance au tractus gastro-intestinale	71
3.6.1.1	Tolérance à l'acidité	72
3.6.1.2	Résistance à la pepsine	72
3.6.1.3	Tolérance aux sels biliaires	72
3.6.2	Sensibilité aux antimicrobiens	72
3.6.3	Activité hémolytique	73
3.6.4	Analyse statistique	73

4 Résultats	74
4.1 Identification des isolats	75
4.1.1 Dénombrement	75
4.1.2 Isolement et purification	75
4.1.3 pré-identification des isolats	75
4.1.3.1 Aspect macroscopique	75
4.1.3.2 Aspect microscopique	76
4.1.3.3 Caractérisation du genre	76
4.1.4 Identification génotypiques des souches	83
4.1.4.1 Extraction l'ADN	83
4.1.4.2 Amlification rep-PCR	83
4.1.4.3 Traitement bioinformatique les gels électrophorèses .	86
4.1.4.4 Séquençage et traitement bioinformatiques	86
4.2 Analyse phylogénique et moléculaire des souches	94
4.3 Caractérisation des aptitudes technologiques	98
4.3.1 Pouvoir acidifiant	98
4.3.2 L'activité protéolytique	100
4.3.3 La mise évidence l'activité antagonisme	101
4.3.4 Antibiogramme	103
4.3.5 Production de diacétyle	104
4.3.6 Production EPS	105
4.4 Aptitudes probiotiques des souches étudiées	105
4.4.1 Résistance à l'acidité	105
4.4.2 Résistance aux sels biliaire	107
4.4.3 Résistance à la pepsine	108
4.4.4 Thermorésistance	110
4.4.5 Activité hémolytique	114
5 Discussion	115
5.1 Isolement et identification des isolats	116
5.2 Identification génotypique des isolats	120
5.3 Caractérisation Technologiques des souches	121
5.4 Caractérisation probiotiques des souches	126
6 Conclusion	128
6.1 Conclusion	129
Conclusion	131

Bibliographie	131
7 Annexe	153
7.1 Milieux de culture	154

Table des figures

2.1	Hydrolyse du lactose en glucose et galactose (CAO et al., 2000).	12
2.2	Photographie de microscopie électronique à balayage de <i>Lactobacillus salivarius</i> adhérant à des cellules Caco-2.	33
3.1	Protocole d'isolement des bactéries lactiques	52
3.2	Diagramme illustrant les étapes suivies pour préparer l'inoculum.	58
3.3	La galerie API 50 CHL avant l'ensemencement	59
3.4	La galerie API 20 Strep avant l'ensemencement	59
3.5	Extraction d'ADN bacterien selon (ADIMPONG et al., 2012).	61
3.6	Le principe de fonctionnement de la rep- PCR.	62
3.7	Les étapes d'obtention du gel d'Agarose	65
3.8	Interface de site service blaste NCBI pour la soumission des séquences on line sur le site https ://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast	66
3.9	Interface de construction l'alignement les séquences du gènes 16S rRNA des souches bacilles obtenues réalisée par logiciel MEGA7	67
3.10	Diagramme montrant les étapes suivies pour l'évolution du pouvoir antimicrobien des bactérie lactiques (MAGHNIA et BENSOLTANE, 2011)	70
4.1	Aspect microscopiques des isolats (sur MRS et M17)x40 ((a) <i>Lactobacilles</i> (b) <i>Strptocoques</i> ou <i>Entrocoques</i>).	77
4.2	Aspect microscopique des isolats (x100) .((a) <i>Lactobacillus sp</i> (b) <i>Strptocoques sp</i>)	78
4.3	Test de lait de Sharman de 0.1% .(a)Résultats négatives, (b)Résultats positives)	79
4.4	Exemple de résultat obtenu pour la galerie API Strep de la souche examinée (E1)	80

4.5	Exemple de résultat obtenu par galerie API50CHL de la souche examinée (LB1).	80
4.6	Traitement avec logiciel Pib-Win des résultats obtenus pour les souches identifiées par galerie API 50 CHL et Api strep	81
4.7	Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG) ₅ rep-PCR des isolats de type bacille identifiés par API 50 CHL. (M1 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp B2-B24 :les souches identifiés, M2 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp)	84
4.8	Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)₅ rep-PCR des isolats de type cocci identifiés par API 20 strep. (M1 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp B2-B22 :les souches identifiés, M2 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp).	85
4.9	Dendrogrammes et profils (GTG) ₅ rep-PCR de isolats bacilles chargés sur le gel de la figure (4.1).	87
4.10	Dendrogrammes et profils (GTG) ₅ rep-PCR de isolats cocci chargés sur le gel de la figure (4.2).	88
4.11	Traitement avec logiciel d'édition et correction chromas de chromatogrammes pour les séquences de gène 16S rDNA de la souche (LB1)	89
4.12	Séquence du produits fini de PCR forward (27F) 5'-3' de la souche (LB1) après le Traitement par logiciel chromas V version 1.45	90
4.13	Séquence du produits fini de PCR reverse (1492R) 3'-5' de la souche (LB1) après le traitement par logiciel	91
4.14	La Soumission des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant le service NCBI (BLAST)	92
4.15	Exemple de résultat obtenu du graphique d'alignement d'une séquence du gène 16 rDNA en utilisant le service BLAST de NCBI	92
4.16	Exemple de Résultat descriptif obtenu des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant service BLAST de NCBI	93
4.17	Exemple de résultat descriptif obtenu d'alignement des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant le service Blast de NCBI	93
4.18	Exemple de résultat obtenu d'alignement les séquences du gène 16S rRNA des souches identifiés en utilisant MEGA7	96

4.19 Exemple de résultat obtenu de Calcule la divergence et la diversité évolutive des séquences du gène 16S rRNA des souches identifiés en utilisant logiciel MEGA7	96
4.20 Arbre phylogénétique des souches de <i>Lactobacillus sp</i> en utilisant la méthode Neighbor-joining	97
4.21 Arbre phylogénétique des souches de <i>Entrpcoccus sp</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> en utilisant la méthode Neighbor-joining	97
4.22 Evolution de l'acidité et le pH en D° dans lait écrémé des LAB incubé à 42°C	99
4.23 Résultat de l'activité protéolytique des souches testées. LB1 : <i>Lb. bulgaricus</i> , LB2 : <i>Lb. Lactis</i> .LB3 : <i>Lb. rhamnosus</i> , ST1 : <i>Strptococcus thermophilus</i>	100
4.24 Exemple de Résultat obtenu de l'activité antagonisme des souches vis-à-vis E.coli LB1 : <i>Lb. bulgaricus</i> , LB2 : <i>Lb. lactis</i> .LB3 : <i>Lb. rhamnosus</i> , ST1 : <i>Strptococcus thermophilus</i>	103
4.25 Exemple de résultat de l'antibiogramme obtenu pour souche (LB1) et (LB2)	104
4.26 Résultats de production diacétyle (a) LB1,LB2,LB3 (b) :E1 E2,ST1 .	104
4.27 Effet d'un milieu acide à pH 2 sur la viabilité des souches examinées de (<i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Enterococcus sp</i>).	106
4.28 Effet d'un milieu acide à pH 2 sur la viabilité des souches examinées de (<i>Lactobacillus sp</i>	106
4.29 Effet des sels biliaire à 0.3% sur la viabilité des souches examinées de (<i>Streptococcus thermophilus</i>) et (<i>Enterococcus sp</i>)	107
4.30 Effet des sels biliaire à 0.3% sur la viabilité des souches examinées de (<i>Lactobacillus sp</i>)	108
4.31 Effet d'un milieu acide à pH 2 avec la pepsine sur la viabilité des souches examinées de (<i>Streptococcus thermophilus</i>) et (<i>Enterococcus sp</i>)	109
4.32 Effet d'un milieu acide à pH 2 avec la pepsine sur la viabilité des souches examinées de (<i>Lactobacillus sp</i>)	109
4.33 Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées (a) LB1 (<i>Lb.bulgaricus</i> (b) :LB2(<i>Lb.lactis</i>)	111
4.34 Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées (a) ST1 (<i>S.thermophilus</i>). (b) :LB3(<i>Lb.rhamnosus</i>)	112
4.35 Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées(a) E1(<i>Ent.faecium</i>) (b) : E2(<i>Ent.faecalis</i>).	113



Liste des tableaux

2.1	Composition du 100g de lait de différents élevages laitière.	8
2.2	de souches de probiotiques dans des produits	34
2.3	Bactériocines représentatifs produits par LTA (Adapté de la Colline 1995).	41
2.4	Les genres bactériens qui produisent les bactériocines	42
3.1	Les sites d'échantillonnage et les codes des échantillons	50
3.2	Les amorces universelles utilisées.	64
4.1	Dénombrements de LAB à partir des différents échantillons en (cfu/ml)	75
4.2	Résultats d'identification phénotypique des souches isolées.	82
4.3	d'acidité et PH après 72 d'incubation	98
4.4	Activité protéolytique des souches étudiées avec l'évaluation de l'zone hydrolyse	101
4.5	Diamètre des zones d'inhibition des 6 souches vis-à-vis les trois souches pathogènes.	102
4.6	Résultat de l'antibiogramme des souches vis-à-vis les antibiotiques utilisés	103

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

dNTP : désoxyribonucléoside 5'-triphosphate

EDTA : éthylène diamine tétraacétate de sodium

mM : millimole par litre

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

SDS : dodécyl sulfate de sodium

g/l : gramme par litre

NaCl : Chlorure de sodium

Na₂HPO₄ : phosphate disodique

MRS : Man Rogosa Sharp

Ufc : unité formant colonies

TE : Tris EDTA

U : unité

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

F : Forward primer

R : Reverse primer

MRS-BCP : Milieu MRS additionné de Pourpre de Bromocrésol

Mal : Maltose

Man : Mannitol

Raf : Raffinose

Rib : Ribose

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Lb : *Lactobacillus*

Chapitre 1

Introduction Générale

Les probiotiques sont des micro-organismes non pathogènes qui ingérés dans quantités suffisantes, exercent une influence positive sur la santé de leur hôte . Pour ces raisons, la consommation de probiotiques contenus dans la nourriture est très populaire dans le monde entier(ALAKAR et al., 2017).

Il y a un grand nombre de probiotiques (bactéries lactiques) actuellement utilisés et disponibles dans les produits laitiers fermentés , en particulier dans les yaourts, les fromages, le kéfir(ABUSHELAIIBI et al., 2017).

Les bactéries lactiques constituent un groupe diversifié d'organismes fournissant des avantages considérables pour l'humanité, certains comme naturels habitants du tractus intestinal et d'autres comme fermentatif.

Les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire, conférant saveur, texture et possèdent un agent de conservation . Au-delà, certaines espèces sont administrées aux humains en tant que suppléments microbiens vivants, influençant positivement notre santé principalement en améliorant la composition du microbiote intestinal. Pour cette raison, ils sont appelés probiotiques (Abdelmalek and Bensoltane., 2015).

Plusieurs bactéries lactiques sont employées se forme de ferments concentrés dans les industries de fermentation en particulier les industries laitières, parmi ceux : *Lactobacillus Streptococcus* et *Enterococcus* qui sont utilisées comme probiotiques c'est -à- dire, une préparation microbienne ayant une action bénéfique sur la santé de l'hôte après l'ingestion (réduire les infectieux) (LOUMANI et BENSOLTANE, 2016) .

Les effets physiologiques liés aux bactéries probiotiques comprennent la réduction du pH de l'intestin, la production de quelques enzymes digestives et vitamines, la production de substances antibactériennes, par exemple des acides organiques, des bactériocines, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyle, de l'acétaldéhyde, sys-

tème lactoperoxydase, lactones et autres substances, non identifiés la reconstruction de la microflore normal de l'intestin après les troubles causés par les diarrhées, l'antibiothérapie et la radiothérapie, la réduction du taux de cholestérol dans le sang, la stimulation des fonctions immunitaires, la suppression des infections bactériennes, l'élimination de cancérigènes, amélioration de l'absorption du calcium ainsi que la réduction de l'activité enzymatique fécale((LOUMANI et BENSOLTANE, 2016) .

L'isolement des souches microbiennes se fait par les méthodes phénotypiques (caractérisation physiologique et biochimiques) et les méthodes génotypiques les plus récentes comme le rep-PCR et séquençage 16s rDNA qui sont les plus employées par les chercheurs microbiologistes pour obtenir des cultures pures destinées à l'utilisation scientifiques ou industrielles (BENNAMA et al., 2012) .

L'utilisation de ces bactéries dans ces inductrices demande des connaissances obligatoire sur les propriétés technologiques tels que l'acidification , la protéolyse , la production des exopolysaccharide pour un usage industriel (HASSAÏNE et al., 2008). Dans ce contexte, le présent travail s'intéresse sur :

1-L'isolement des souches lactiques thermophiles à partir de l'écosystème laitière naturel et variées (chèvre, vache, brebis, chamelle).

2- L'identification phénotypique par les caractères physiologiques et biochimiques.

2- L'identification génotypique en utilisant la méthode rep PCR et séquençage 16S rDNA.

3- Les Aptitudes technologiques en étudiant l'acidité titrable, l'activité antagonisme et protéolytique et antibiorésistance.

4- Le potentiel probiotique en focalisant sur la tolérance à l acidité et aux Sels biliaires, la thermorésistance, et l'activité hémolytique .

La présente thèse est scindée en trois chapitres à savoir :

⇒ le premier chapitre est présenté sous forme de revue bibliographiques qui porte sur l'état des connaissances général sur les élevages , les laits fermentés , et spécifique sur les bactéries lactiques et leurs rôle technologiques et probiotiques .

⇒ le second chapitre concernera la partie expérimentale et technique.

⇒ le troisième chapitre est fondamentalement consacré à la présentation et l'interprétation des résultats obtenus à l'issue de nos investigations.

Enfin, une discussion détaillée avec une comparaison des résultats obtenus par d'autres investigateurs.

Chapitre **2**

Recherche Bibliographique

2.1 Élevage

En Algérie la filière élevage observe un rythme singulier de croissance depuis quelques années. En 2014, le cheptel national, tous types de ruminants confondus, dépasse le cap des 34 millions têtes, selon les statistiques des services spécialisés du ministère de l'agriculture et du développement rural.

Par type de cheptel, les ovins représente 26,88 millions de têtes suivis par les caprins de 1,9 millions suivis par les bovins 1,7 millions ainsi plus de 344 000 têtes camelines. Aux termes de ce nouveau recensement, l'on relèvera une extension exceptionnelle de ce dernier, en l'occurrence le cheptel ovin, qui passe ainsi de 21 millions à plus de 26 millions têtes entre 2010 et 2014, soit une croissance qui avoisinerait 25%.

En Algérie il y a une spécialisation des zones agroécologiques en matière d'élevage. L'élevage bovin reste cantonné dans le Nord du pays avec quelques incursions dans les autres régions. Les parcours steppiques sont le domaine de prédilection de l'élevage ovin et caprin avec plus de 90 % des effectifs qui y vivent entraînant une surexploitation de ces pâturages.

Le cheptel camelin représente 1.12% de l'effectif global. Il est réparti, surtout, dans les zones steppiques et dans les zones arides. Cette dernière décennie les éleveurs commencent à s'intéresser aux élevages camelines pour produire la viande et le lait. Le lait camelin attire les éleveurs pour ces capacités nutritionnelles et thérapeutiques (BADEL et al., 2011).

2.1.1 Ovins

L'ovin algérien dispose d'une grande diversité ; celle ci peut s'apprécier en simultané par le nombre global de types de populations et du nombre de celles ayant un effectif nécessaire . il y une importante concurrence au niveau de ces types de populations locales, de puis les changements des dispositifs de production et les changements socioéconomiques qui ont touché l'Algérie pendant les quatre nouvelles décades. On remarque une augmentation importantes des effectifs et des produits de croisement entre les différentes races algériennes. La classification des ovins en Algérie est basée sur l'existence de deux grandes races qui à leur tour présentent intrinsèquement des variétés, la plupart du temps identifiées à des régions :

La race Ouled Djella : Nommée aussi la race arabe blanche dite, le mouton « Ouled-Djellal » compose l'ethnie la plus essentielle des races ovines algériennes, occupant la majeure partie du pays à l'exception de quelques régions dans le Sud Ouest et le Sud-Est . C'est la meilleure race à viande en Algérie . C'est le véritable

mouton de la steppe, le plus adapté au nomadisme. La race est entièrement blanche à laine fine et à queue fine, à taille haute, à pattes longues aptes pour la marche . Elle craint cependant les grands froids, la laine couvre tout le corps jusqu'au genou et au jarret pour certaines variétés (MAMI et al., 2008).

La race Hamra ou Beni Ighil : La race Hamra appréciée vient en deuxième position à environ 4 millions de têtes après ouled djellal de 22 % du cheptel ovin algérien. Cependant cette race est en voie de disparition en raison de son effectif de 60000 têtes de 5% au totale de cheptel ovin algérien.

C'est une race à l'origine berbère, de petite taille à ossature fine et aux formes arrondies, sa conformation est moyenne et généralement considérée comme la mieux conformée des races algériennes . La peau est brune, la tête et les pattes sont brun-rouge foncé presque noirs, la laine est blanche avec du jarre volant brun-roux, les cornes sont spiralées et moyennes, le profil est convexe avec un chanfrein busqué, la queue est fine et de longueur moyenne et les oreilles sont moyennes et tombantes. Possèdent des caractéristiques exponentielles c'est le cas de la résistance au froid et aux vents glacés des steppes de l'oranie avec l'exigeante en qualité de pâturage. cette race a trois variétés principales :

- ⇒ Le type d'El Bayed - Méchria : est caractérisé par la couleur acajou foncée.
- ⇒ Le type d'El Aricha - Sebdou : est caractérisé par couleur presque noire. c'est la variété préférable.
- ⇒ Le type Malakou et Chott Chergui de couleur acajou clair .

2.1.2 Caprins

Le cheptel caprin algérien vient en deuxième position après l'ovin , il est concentré dans les régions difficiles comme les steppes , les régions montagneuses et oasis. quatre races algériennes ont été recensées à savoir :

La chèvre Arabia : race domestique localisée dans la région de Laghouate subdivisée en deux sous types, l'un sédentaire et l'autre, transhumant, comparativement au type transhumant, le type sédentaire possède des poils plus longs , 14 à 21cm contre 10 à 17cm pour le type transhumant.

La chèvre Makatia : localisée dans les hauts plateaux et le Nord de l'Algérie, elle est utilisée principalement pour la production de lait et de viande, appréciée aussi pour sa peau. c'est une race de grande taille et de couleurs variées (GHAZIFATIMA, 2014).

La chèvre Kabyle : de petite taille, elle peuple abondamment les massifs monta-

gneux, de la Kabylie, des Aurès et du Dahra. Son poil est long, de couleur généralement brun- foncé, parfois noire, la tête de profil courbée est surmontée de cornes. **La chèvre du M'zab** : chèvre principalement laitière, appelée également Touggourt, elle est originaire de M'tili, dans la région de Ghardaïa mais peut toutefois être trouvée dans toute la partie septentrionale du Sahara. L'animal est de taille moyenne (65cm), son corp allongé, droit et rectiligne, sa tête est fine et cornée, alors que sa robe présente trois couleurs, le chamois dominant, le blanc et le noir .

2.1.3 Bovins

L'élevage bovin est fortement combiné avec l'agriculture. son évolution dépend du développement de l'agriculture , en outre, selon (SKOURI, 1993) , il ya une grande association de l'agriculture, l'élevage et les forêts. cette association permet d'une part de créer les postes d'emploi , et d'autre part d'augmenter le rendement agricole par la fumure animale .

Les races locales représentées en race brune de l'Atlas, se trouvent dans les zones montagneuses et le nord de l'Algérie. Comparativement aux races importées, les races locales sont caractérisées par l'adaptation aux conditions difficiles du milieu. En effet, elles sont adaptées à la marche en terrains difficiles, aux variations des régimes alimentaires, la résistance à la sous alimentation et aux maladies . Selon la région, la race locale comprend : - La chélifienne, est caractérisée par un pelage fauve. - La Sétifienne, à pelage noirâtre, s'adapte bien aux conditions rustiques. - La Guelmoise, à pelage gris foncé, vivant en zones forestières - La Cheurfa, à robe blanchâtre, vivant en zones près forestières (Ministère de l'agriculture, cité par (NEDJRAOUI, 2001).

Le cheptel des races locales : représente 48% des effectifs nationaux et n'assure que 20% de la production du lait de la vache .

Les races hautes productrices : Les races hautes productrices ou bovins laitiers modernes (BLM), sont des races d'importation à haut potentiel génétique d'origine européenne. L'introduction de ces races était depuis la colonisation du pays , et représentent 9% à 10% du total du cheptel national, soit 120000 à 130000 têtes, ce cheptel assure 40% de la production du lait (EDDEBBARH, 1989).

Les races améliorées ou mixtes : Elles sont des races issues de multiples croisements entre la race locale et les différentes races importées pour l'amélioration de la production. Ces races importées qui ont un potentiel génétique élevé mais leurs performance diminuent par rapport à leurs pays d'origine. Les effectifs sont estimés

de 555000 têtes, ils représentent 42 à 43% du cheptel national et assurent 40% de la production du lait (BENCHARIF, 2001).

2.1.4 Camelins

Le dromadaire est une espèce animale la plus susceptible au niveau de l'exploitation des régions difficiles semi arides et désertiques dans l'Afrique et l'Asie en s'adaptant aux climats de ces régions à la déshydratation et la sous-alimentation. Les productions du dromadaire (lait, viande, cuir et travail) permettent aux populations pastorales de vivre et d'avoir une activité économique dans un milieu a priori défavorable à la survie de l'Homme. De nos jours, la viande de dromadaire est aussi proposée sur les différents marchés sahéliens. Plus économique que celle des bovins et des petits ruminants, elle a pris une part du marché croissante à la faveur des pénuries de viande bovine pendant les épisodes de sécheresse et de baisse du pouvoir d'achat des populations (SAHRAOUI et al., 2014).

2.2 Le lait

2.2.1 Historique

Pendant des millions d'années, l'homme vécut de chasse et de cueillettes qui lui procuraient, entre autres, de la viande, des œufs, du miel et du poisson.

Il y a environ 10 000 ans, la découverte de l'agriculture et de l'élevage lui assurait une certaine sécurité alimentaire, un habitat fixe et ouvrait ainsi l'ère des grandes civilisations.

L'élevage des animaux laitiers qui date d'environ 8 000 ans a ouvert des perspectives alimentaires chaque jour plus prometteur.

Il est à noter que le culte du lait est imprégné de la vie religieuse de l'Inde ancienne. La conception de la sainteté de la vache était particulièrement puissante dans l'antiquité en Égypte, en Iran et en Inde.

On peut ainsi expliquer les tendances anti-carnivores et végétariennes de certains asiatiques. En Europe, les moines, notamment les Bénédictins, sont au Moyen Âge les principaux producteurs de fromages : le pont l'évêque, le munster. Les seigneurs revenant des croisades leur apportent des recettes d'Orient qui enrichissent leurs créations.

Ainsi, avant la révolution scientifique et industrielle qui a eu lieu en Europe au cours

du XIX^e siècle, les techniques de fabrication de lait fermenté, de beurre, de fromage étaient déjà au point.

2.2.2 Variation de la composition du lait

Suivant les espèces animales et les races au sein d'une même espèce ; la composition du lait varie également chez une même laitière en fonction de la période de la lactation et de l'alimentation (LUCEY et al., 1998). C'est pour cette raison qu'on ne peut parler que de compositions moyennes. Donnons la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100 g). 2.1

TABLE 2.1: Composition du 100g de lait de différents élevages laitière.

	Eau	Prptéines	graisse	Lactose	cendre
Vache	87.2	3.5	3.7	4.9	0.72
Chèvre	86.5	3.6 4	5.1		0.82
Brebie	82.7	5.5	6.4	4.7	0.92
Chamelle	87.7	3.5	3.4	4.8	0.71

2.2.3 Valeur alimentaire du lait

Dès la découverte du lait l'homme se rendit compte de la grande valeur alimentaire de ce produit et du fait qu'il était très périssable : d'où le besoin de créer le lait fermenté et fromage qui n'était qu'une technique de conservation du précieux aliment. Ainsi donc les empiriques savaient parfaitement que le lait est un aliment de très grande valeur.

Ces connaissances seront confirmées par le développement de la chimie et de la nutrition. Celles-ci permirent de savoir que le lait est composé d'eau, de glucides (lactose) en solution, de protéines en suspension colloïdale, de lipides en émulsion, de sels minéraux (calcium, phosphore, . . .) de vitamines liposolubles et hydrosolubles etc.

Parmi les nombreuses vitamines que contient le lait, trois méritent une attention particulière : la vitamine A (croissance, protection de la peau et des muqueuses mécanisme de la vision crépusculaire) ; la vitamine D (anti rachitique, meilleure fixation du calcium) ; la vitamine B2 (utilisation des glucides, protides, lipides). Cette présence dans le lait de tous les éléments essentiels de l'alimentation humaine a fait dire, pendant longtemps, que le lait est un aliment complet. Grâce aux progrès de la chimie

et de la nutrition, on s'est rendu compte de sa pauvreté en fer, en certains oligo-éléments et vitamines, en fibres. Cependant, le lait et les produits laitiers restent les plus complets des aliments.

Ils constituent même, à eux seuls, un groupe particulier d'aliments, celui du lait et des fromages ou deuxième groupe.

Les groupes étant :

⇒ 1^{er} groupe : viandes, poissons, oeufs.

⇒ 2^{me} groupe : corps gras. (beurre, huiles végétales, graisses alimentaires).

⇒ 3^{me} groupe : légumes et fruits crus.

⇒ 4^{me} groupe : céréales et dérivés.

⇒ 5^{me} groupe : légumes et fruits crus.

⇒ 6^{me} groupe : légumes et fruits secs.

Il conviendrait de faire un bref commentaire sur l'excellence du lait comme source de protéines et de calcium et sur les équivalences alimentaires.

2.2.4 Le lait, excellente source de protéines et de calcium

2.2.5 Le lait, source de protéines

Les protéines du lait ont, en gros, la même composition que les protéines totales de l'œuf (protéines de référence), sauf en ce qui concerne le taux de méthionine et de cystine, sensiblement plus bas. En effet, les acides aminés soufrés sont les facteurs limitants du lait. La caséine et, à plus forte, le complexe protidique du lait contiennent en bonne proportion tous les acides aminés indispensables à la croissance et à l'entretien.

Le lait peut donc remplacer la viande, le poisson et les œufs selon les équivalences suivantes : 1/4 de litre de lait = 35 g de fromage pâte ferme = 50 g net de viande = 50 g net de poisson = 1 œuf 1/3 (de 50 g).

2.2.6 Le lait source de calcium

Le lait et les fromages sont, en pratique, la principale source de calcium. Avec des rations insuffisantes en lait et en fromage, il est impossible d'équilibrer une alimentation sur ce point.

En effet, le calcium ne se rencontre ailleurs en quantité notable que dans les légumes et les fruits. En apport de calcium, on a les équivalences suivantes : 1/4 de litre de

lait = 850 g de choux = 1 kg d'oranges.

Diminuer le lait obligerait à consommer des quantités énormes de végétaux. En outre, il faudrait souligner que le calcium du lait est :

⇒ mieux assimilé que celui de toute autre source, car le lait contient d'autres éléments favorables à cette assimilation (présence de protéines, de graisses et un peu d'acide lactique provenant de la transformation du lactose).

⇒ mieux utilisé dans l'organisme car le lait apporte en même temps du phosphore en bonne proportion et un peu de vitamine D.

2.2.7 Animaux et systèmes de production du lait

Avant tout, il conviendrait de souligner que la production laitière est une activité d'élevage et comme telle dépend de trois paramètres : l'homme, l'animal, le milieu.

2.2.7.1 L'homme

C'est l'éleveur. Lorsqu'il est peu intéressé par la production laitière celle-ci sera faible (cas des populations soudanaises et forestières) alors qu'elle sera importante si l'éleveur donne une grande considération au lait (cas des populations sahéniennes).

2.2.7.2 L'animal

C'est la femelle laitière, sa production dépendra des aptitudes de l'éleveur à l'améliorer, à la nourrir et à la soigner.

2.2.7.3 Le milieu

Est appelé aujourd'hui l'environnement. Il conditionne la production laitière par le climat, la pathologie et les ressources fourragères, mais aussi et surtout la demande de lait, en Afrique de l'Ouest les femelles laitières sont les chèvres, les brebis et les vaches, leur élevage est traditionnellement lié aux zones agro-écologiques et à la pathologie notamment aux trypanosomoses :

⇒ **zone aride et semi-aride** : où les tsé-tsé sont absentes - Sahel - les chèvres et brebis de grande taille, les dromadaires et les zébus constituent les troupeaux .

⇒ **zone subhumide** : où les tsé-tsé sont localisées - région sud-soudanaise - ce sont les taurins de grande taille, les brebis et les chèvres djallonkées qui sont élevées.

⇒ **zone humide** : où les tsé-tsé sont disséminées - forêt - taurins de petite taille,

brebis et chèvre naines constituent les ruminants domestiques ; dans cette zone, traditionnellement il n'y a pas de production laitière.

Chacun des systèmes présente des contraintes techniques et socio-économiques spécifiques parmi lesquelles : le faible niveau de disponibilité en aliment (quantité et qualité) en saison sèche ; les problèmes de santé animale ; les faibles taux de reproduction des animaux ; le faible potentiel génétique des races locales pour la production laitière ; le faible pouvoir d'achat des consommateurs ; absence de services d'appui en banques de gènes, en vulgarisation, en marchés d'intrants et de commercialisation (collecte et distribution) ; manque de maîtrise des techniques de transformation et de conservation du lait en période de surproduction ; compétition homme-veau pour le lait. En matière de production laitière, la maîtrise de trois domaines est indispensable pour augmenter la rentabilité du cheptel et la quantité du lait : la santé, l'alimentation et la génétique.

2.3 Le yaourt

2.3.1 Définition

La réglementation québécoise attribue l'appellation yaourt à un lait (entier, partiellement écrémé ou écrémé) ayant subi une fermentation par l'action conjointe des bactéries lactiques thermophiles *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* . Les quatre principaux types de yaourts que l'on retrouve sur le marché sont fermes, brassés, à boire ou encore les yagourts glacés (JIE et al., 2005).

2.3.1.1 Fabrication de yaourt

2.3.1.2 Matière première

Le lait est l'ingrédient de base pour toute fabrication de yaourt. Alors que l'Amérique du Nord préconise l'utilisation du lait de vache pour la production de yaourts commerciaux, le lait de plusieurs autres espèces de mammifères (par exemple chèvre ou buffle, pour ne nommer que ceux-ci) peut aussi être employé. En termes de composition chimique, quelques variations sont observées selon l'espèce choisie.

Le lait de vache est constitué en majeure partie d'eau, soit généralement à près de 87.5%, Il contient aussi un mélange complexe de divers composants : des glucides (4.6%), des matières grasses (3.7%), des protéines (3.2%), ainsi que des vitamines et des minéraux (0.8%) (KOÏCHE, 2011).

La plupart de ces constituants peuvent avoir un effet sur le produit fini tant au niveau des propriétés organoleptiques que rhéologiques. Par exemple, la présence de

gras dans un yaourt influence l'onctuosité, la sensation en bouche et peut améliorer la rétention d'eau dans le produit.

Le lactose, un diholoside constitué d'un galactose et d'un glucose (3-galactosido (1-4) glucose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), qui est le sucre principal du lait et est aussi celui qui est utilisé par les bactéries lactiques pour leur croissance lors de l'étape de la fermentation, figure (2.1).

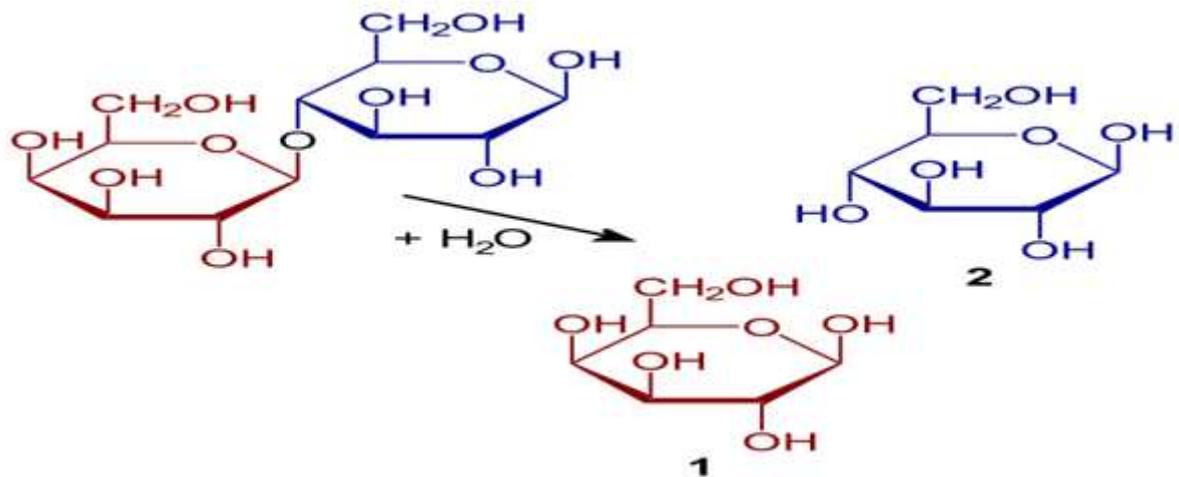


FIGURE 2.1: Hydrolyse du lactose en glucose et galactose (CAO et al., 2000).

Les protéines jouent aussi un rôle important. Deux catégories sont retrouvées dans le lait et elles sont classées d'après leur solubilité dans l'eau ainsi que leur stabilité :

⇒ les protéines insolubles et les protéines solubles. Les premières se retrouvent dans la suspension colloïdale et se regroupent sous la forme de micelles, soit les caséines. Il en existe quatre types nommées respectivement caséines α_1 , α_2 , β , et κ . Celles-ci, qui englobent près de 80% de toutes les protéines du lait, sont chargées négativement, et précipitent sous l'action d'une présure ou d'un abaissement du pH à 4.6, soit leur point isoélectrique (IVANOVA AND MITEVA et al., 1998).

Les protéines du sérum, ou protéines sériques, se retrouvent quant à elles sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont l' α -lactalbumine et la P-lactoglobuline, qui précipitent sous l'action de la chaleur (NES et al., 2000).

2.3.2 Préparation et standardisation du mélange laitier

Afin de répondre aux critères d'acceptabilité d'un yaourt, il est important d'obtenir les propriétés physiques désirées telles que une viscosité et une consistance satisfaisante.

Plusieurs étapes sont impliquées afin d'atteindre les attributs recherchés. Notamment, on compte l'étape d'enrichissement du lait, ou plus précisément la standardisation du mélange laitier (KOÏCHE, 2011). D'abord, le niveau de solides totaux, qui, au départ, se situe à près de 9% pour un lait écrémé est élevé à 14-16% pour la fabrication de yaourt (NES et al., 2000).

Ceci permet entre autres d'augmenter la viscosité apparente du produit (Wu et al., 2009; (Lúcia et al. 2006).

Le niveau de solides non-gras (soit principalement le lactose, les protéines et les minéraux) se situe quant à lui normalement entre 8.2-8.6%. Dans de nombreux pays, il est d'usage d'ajouter des poudres de lait, dont la poudre de lait écrémé (PLÉ), laquelle est très répandue. Celle-ci, en plus des poudres de caséine, permet d'augmenter et d'ajuster le niveau de protéines du produit afin de contrer les variations saisonnières des composantes laitières qui sont observées dans l'industrie, et du même coup d'augmenter la viscosité du produit (IVANOVA AND MITEVA et al., 1998).

Depuis le début des années 1990, l'ajout de poudres dérivées du lactosérum au lait destiné à la fabrication de yaourt a largement été étudié.

Parmi les plus répandues, on retrouve les concentrés protéiques de lactosérum (CPL) ainsi que les isolats protéiques de lactosérum (IPL), qui sont ajoutés à des taux va-

riant entre 0.6 et 4%. Leur effet positif sur la rétention d'eau et sur la fermeté du gel a été démontré (BOUTON et al., 1993). L'ajout d'agents stabilisants, les polysaccharides commerciaux, est courant en Amérique du Nord.

Les polysaccharides les plus utilisés sont la gélatine, l'amidon, l'alginate, la carraghénane ou certains dérivés de cellulose, selon la législation (TAJKARIMI et al., 2010). Leur fonction première est d'apporter une certaine consistance au gel. De plus, ils exercent un pouvoir de rétention d'eau sur le produit. Ces agents stabilisants s'avèrent bénéfiques pour le maintien de la texture du produit, considérant tous les traitements mécaniques pouvant être appliqués (brassage, pompes divers, lissage) durant sa production (TAMIME et al., 2007).

2.3.2.1 Homogénéisation et traitement thermique du lait

L'étape d'homogénéisation force le lait à passer dans une tubulure sous haute pression. Par ce mécanisme, il est possible de réduire la taille des globules de gras, qui sinon pourraient avoir tendance à s'agglomérer entre eux et/ou à remonter en surface du produit. Alors que la taille d'un globule varie normalement entre 1 et 10 μm , l'homogénéisation exercée permet de la réduire à moins de 2 minutes (TAMIME et al., 2007).

Ce traitement mécanique permet d'autant plus d'intégrer et de dissoudre les poudres fortifiantes ajoutées précédemment au lait, pour ainsi améliorer la stabilité, la consistance du gel et même en élever la valeur de module élastique (G') (SODINI et al., 2004).

Le lait destiné à la fabrication de yaourt a toujours subi un traitement thermique, et ce, même de façon traditionnelle.

En plus de permettre l'élimination de microorganismes non-désirables et/ou pathogènes, le but de celui-ci était, à l'origine, d'amener le lait à son point d'ébullition pour ainsi le réduire aux deux tiers de son volume initial. Ceci était, anciennement, une façon d'augmenter le niveau de solides (cette méthode demeure toutefois pratiquée actuellement dans certaines laiteries confectionnant le yaourt de façon artisanale). De nos jours, une étape du traitement thermique est toujours présente afin d'éliminer les bactéries indésirables, mais aussi de créer des modifications physico-chimiques du lait. Ainsi, plusieurs types de traitements thermiques différents peuvent être appliqués, allant d'une simple thermisation à $<65^{\circ}C$ ne provoquant aucun changement irréversible des constituants laitiers jusqu'à un traitement pouvant frôler les $150^{\circ}C$, qui altère grandement les propriétés physico-chimiques du lait et qui a comme risque de se répercuter sur la couleur et la saveur de celui-ci (TAMIME et al., 1999).

Les traitements thermiques courants sont de l'ordre de 85°C durant 30 minutes, ou encore de 90-95°C avec retenue allant de 5 à 10 minutes (TRACHOO et al., 2002). La principale modification encourue est la dénaturation des protéines sériques dont la P-lactoglobuline et l'a-lactalbumine (pour cette dernière, le traitement thermique doit toutefois être sévère) (LAWS et al., 2001).

L'ouverture de la structure globulaire de ces protéines favorisera les interactions avec la caséine K, qui forme la partie externe de la micelle, par la formation d'un pont disulfure (-S-S-) (KETHIREDDIPALLI et al., 2010).

La dénaturation et l'association de l'a-lactalbumine résulte en une surface micellaire plus lisse (KETHIREDDIPALLI et al., 2010). Le traitement thermique a aussi des répercussions sur d'autres constituants du lait, dont l'équilibre salin. Le calcium, le phosphate, le citrate et le magnésium sont des sels pouvant exister sous forme d'ions solubles ou encore sous forme colloïdale dans le complexe protéique, que sont les micelles de caséine (TAMIME et al., 1999).

Sous l'effet de la chaleur, il a été observé qu'une fraction du calcium soluble pouvait se retrouver dans la phase colloïdale. Ainsi, l'observation microscopique a révélé une implication des sels, en majeure partie le phosphate de calcium et les citrates, dans la formation de filaments et la création de réseaux protéiques (LOURENS-HATTINGH et VILJOEN, 2001). La chaleur provoque aussi l'inactivation de certaines enzymes et la destruction de vitamines thermolabiles (SAVADOGO et al., 2011).

2.3.2.2 Inoculation, fermentation et conditionnement

Suite au traitement thermique du lait, la température du mélange est abaissée entre 40-45°C en vue d'y ensemercer les bactéries lactiques thermophiles. On inocule alors la préparation de lait avec deux souches bactériennes, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Le ratio d'ensemencement se situe habituellement entre 1/1 et 2/1 pour le yaourt nature mais peut grimper jusqu'à 10/1 dans le cas d'un yaourt aux fruits (SOUKOULIS et al., 2007). La tendance à favoriser les streptocoques par rapport aux lactobacilles s'explique du fait que ces derniers, lorsque présents en trop grande quantité, ont tendance à provoquer une post-acidification du produit ainsi que des arômes non désirables (STUHLMACHER et al., 1998).

L'ensemencement permet d'amorcer la phase d'acidification du lait. Il est préférable d'ensemencer à un taux plus élevé que trop faible, afin de permettre aux bactéries de surmonter les obstacles à leur développement tel un manque de facteurs de croissance ou encore une phase de latence trop longue. Cela permet aussi d'éviter

d'obtenir un produit trop «sableux» en bouche, ou encore qui présenterait de la synérèse comme il serait le cas advenant un ralentissement de l'acidification (JEAN-CLAUDE et OTHERS, 1985).

L'inoculation directe avec des ferments purs ou encore indirecte, qui implique le repiquage de ferments une ou plusieurs fois dans une base de lait, se situe entre 1 et 5% de la préparation (SODINI et al., 2004). Cultivée de façon individuelle, la souche *S. thermophilus* possède une croissance optimisée entre 35-40°C alors qu'une culture de *L. bulgaricus* croît idéalement à une température légèrement supérieure, soit entre 43-45°C (SAVADOGO et al., 2011) .

L'incubation se fait donc en moyenne à près de 42-45°C afin de satisfaire la croissance des deux genres bactériens et de manière à favoriser la synergie entre elles. La fermentation des glucides est le mécanisme biochimique mis en application par les bactéries lactiques. Lors de la fermentation du lait, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* amorce son activité en libérant dans un premier temps des acides aminés suite à la protéolyse des caséines. Or, à ce stade, la croissance de cette souche est minimale. Les nutriments libérés par celle-ci permettent néanmoins aux streptocoques d'amorcer la fermentation du lactose en glucose, galactose et acide lactique car le pH naturel du lait de 6.6 est favorable pour ce genre bactérien (pH optimal de croissance entre 6.0-6.5). Celui-ci procure aux *Lactobacilles* les composantes nécessaires à leur activité fermentaire comme l'acide formique et le gaz carbonique. Lorsque le pH du milieu diminue à moins de 6.0, les *Lactobacilles* quittent la phase de latence pour entrer en phase exponentielle. Elles se mettent donc à hydrolyser les caséines de façon partielle, ce qui libère de courts peptides et des acides aminés qui favorisent davantage la croissance des *Streptocoques*.

Toutefois, la diminution de pH due à la présence toujours croissante d'acide lactique inhibera peu à peu la croissance de ces derniers (SANDINE et al., 1970) . Le catabolisme du lactose par les souches *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* s'effectue à l'intérieur-même des cellules bactériennes. La première étape de la fermentation consiste à amener la molécule de lactose directement à l'intérieur de la paroi de la bactérie. Certains organismes du groupe homofermentatif, dont font partie les bactéries du yaourt, qui, à partir du lactose, ne peuvent produire que de l'acide lactique (FARNWORTH et al., 2007), et transportent ce sucre par le biais des systèmes phosphoenolpyruvate-dépendant et phosphotransferase. Or, le transport le plus communément utilisé par les souches bactériennes *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* se fait à l'aide de l'enzyme galactoside permease, ou encore la lactose phosphotransferase. Par la suite, l'action de l'enzyme P-D-galactosidase est requise pour scinder le lactose afin de libérer une molécule de D-glucose et de P-D-galactose. Le mono-

saccharide D-glucose est métabolisé par la bactérie, tandis que le catabolisme du galactose demeure nébuleux, quoique des études menées à ce sujet aient observé que le galactose ressort de la bactérie pour revenir dans le yaourt (TAMIME et al., 1995) C'est par ce moyen que les bactéries lactiques obtiennent l'énergie nécessaire sous forme d'ATP leur permettant d'assimiler les éléments nutritifs et d'assurer le fonctionnement de leur métabolisme. Les facteurs influençant la vitesse de transformation du lactose (ou glycolyse) auront aussi une influence parallèle sur la vitesse de croissance des bactéries lactiques.

La diminution du pH, provoquée durant la fermentation par l'accumulation continue d'acide lactique, crée des un balancements du mélange laitier et conduit à des modifications physico-chimiques du milieu. Au pH naturel du lait, les micelles de caséines sont chargées négativement et un phénomène de répulsion s'exerce donc entre elles. Lors de l'abaissement du pH à 5.5, leur potentiel de surface (potentiel zêta) est réduit, ce qui permet une agglomération des petites micelles aux grosses. C'est ainsi que l'on observe une augmentation du diamètre moyen des micelles de caséines. Ensuite, un débalancement des sels se produit à $\text{pH} < 5.3$, engendrant la solubilisation du phosphate de calcium micellaire (TAMIME et al., 1999).

La charge initiale des caséines est peu à peu perdue, et la force ionique de la solution augmente (LUCEY et al., 1998), Lorsque le pH atteint une valeur de 5.0, l'agrégation des micelles s'accroît et certaines vont même fusionner entre elles. Le phénomène se poursuit jusqu'à la neutralisation complète de leurs charges au point isoélectrique, qui est atteint au pH de 4.6. À ce stade, les caséines sont dénaturées et peuvent donc subir un étirement, créant une matrice de gel tridimensionnelle avec enchevêtrement des protéines. Les liens qui relient les protéines entre elles sont faibles en énergie et sont constitués principalement de liaisons électrostatiques, hydrophobes (LEE et LUCEY, 2010) .

De façon générale, le processus de fermentation est d'une durée variant entre 3 et 6 heures. Ce coagulum nouvellement créé donnera la consistance et la viscosité du produit (CHAMPAGNE et al., 1996) . Le caillé obtenu par acidification bactérienne possède certes une certaine consistance, mais ce type de gel demeure fragile, peu manipulable et risque de briser facilement, comparativement à un gel issu d'une coagulation enzymatique (TAMIME et al., 1999).

Les composés contribuant à la saveur que l'on retrouve de façon typique suite à la fermentation sont l'acide lactique, l'acétaldéhyde, l'acide acétique, le diacétyl ainsi que certains acides gras volatils. Ces composés procurent respectivement les goûts sûr, légèrement acide, quelque peu vinaigré et avec goût léger de beurre (SALMINEN et VON WRIGHT, 2004).

2.3.2.3 Refroidissement et transport

Au terme de l'incubation, un refroidissement à une ou deux phases est effectué. Dans le cas d'un refroidissement à une phase, il y a abaissement rapide de la température à moins de 10°C. Ce processus, généralement entrepris en fabrication de yaourts fermes, est réalisé en transférant les pots dans une chambre réfrigérée, ou le processus peut être accéléré par le passage dans un tunnel de refroidissement. Un refroidissement à deux phases est quant à lui plutôt adapté pour la production de yaourts brassés. Il requiert une diminution de la température à environ 20°C pour effectuer les étapes de brassage, de lissage, d'addition des fruits (s'il y a lieu) et de conditionnement en pots. Le brassage mécanique du yaourt force la dispersion des particules de gel dans le sérum.

L'étape de lissage, quant à elle, oblige le caillé à passer par une pompe, ce qui permet de détruire les grumeaux pour ainsi donner un gel lisse. Or, des liens seront rapidement reformés de façon à former un gel faible qui reprendra de la consistance durant les premiers jours d'entreposage (WHITE et al., 2008).

Un second stade de refroidissement inférieur à 10°C est effectué sur le produit afin de ralentir l'activité bactérienne des souches thermophiles et de contrôler le plus possible l'acidité du produit.

L'étape de conditionnement et de mise en pots étant la dernière avant la réfrigération, elle n'est pas à négliger puisqu'elle doit assurer la salubrité du produit jusqu'au moment de la consommation. Une stérilisation des pots, au moyen de différents procédés, est donc souvent effectuée.

Finalement, le produit sera transporté (habituellement par voie terrestre) aux différents points de vente, et ce toujours dans le souci de maintenir la chaîne de froid pour éviter toute altération du produit (TAMIME et al., 1999).

2.4 Les bactéries lactiques

2.4.1 Généralités

Les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène de bactéries Gram-positives, est caractérisée par certains traits morphologiques, métaboliques et physiologiques communes. Ce sont des bactéries anaérobies, non sporulées, tolérantes acides produisant de l'acide lactique principalement comme un produit final .

Les bactéries lactiques sont constituées d'un certain nombre de divers genres qui



comprennent deux homofermentaires et hétérofermentaires sur la base du produit de leurs homofermentaires fermentation. Procédé fin de produire de l'acide lactique comme le principal produit de fermentation du glucose et inclure les genres *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Pediococcus*.

En revanche, les hétérofermentaires produisent un certain nombre de produits en plus lactique acide tel que le dioxyde de carbone, l'acide acétique et de l'éthanol à partir de la fermentation du glucose et comprend le genre *Leuconostoc* et un sous-groupe du genre *Lactobacillus* (CHERIGUENE et al., 2007).

Les bactéries lactiques sont constitués d'un certain nombre de genres bactériens au sein du phylum Firmicutes. Études taxonomiques récentes ont suggéré que le groupe de LAB comprend ce qui suit comme genres ; *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (CHAO et al., 2008). Les espèces de ces genres peuvent être trouvés dans le TGI de l'animal et l'homme ainsi que dans les aliments fermentés . Les souches de LAB utilisées comme probiotiques appartiennent généralement à des espèces des genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* ou *Bifidobacterium*. Les bactéries de Gram-positif appartenant à l'embranchement des Actinobacteria, tels que le genre *Aerococcus* , *Microbacterium*, *Propionibacterium* (SARANTINOPOULOS et al., 2001) et *Bifidobacterium* (TUOHY et al., 2001) qui produisent également de l'acide lactique.

Le noyau de LAB des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* partagent une longue histoire d'utilisation en toute sécurité dans le traitement des aliments fermentés. Les effets antimicrobiens et la sécurité des LAB dans la conservation des aliments sont largement acceptée (AMMOR et al., 2007).

Leur effet de conservation est principalement en raison de la production d'acide lactique et d'autres acides organiques qui se traduit par l'abaissement de pH , aussi la préservation est renforcée par la production d'autres antimicrobiens composés, y compris le peroxyde d'hydrogène, le CO₂, le diacétyle, l'acétaldéhyde, et bactéricines (ARIHARA et al., 1993).

En plus de l'effets antimicrobiens spécifique LAB possèdent aussi la promotion de la santé Propriétés. Preuve de systèmes in vitro, des modèles animaux et des études cliniques humaines suggérer que la fonction de LAB comme immunomodulateurs et peut améliorer à la fois spécifiques et non spécifique réponses immunitaires justifiant leur utilisation comme la promotion de la santé ou des suppléments probiotiques à la fois pour les humains et les animaux.

2.4.1.1 Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Ces bactéries possèdent la capacité de produire de l'acide lactique comme métabolite final, et sont classées dans le groupe des bactéries lactiques (COCOLIN et al., 2008).

Ce genre regroupe plusieurs espèces bactériennes qui présentent toutes les caractéristiques suivantes : Gram positif, catalase négatif, sous forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînes très longues, immobiles ou mobiles, asporogènes, anaérobies facultatives, microaérophiles, ne réduisent pas les citrates et elles n'hydrolysent pas la gélatine. Elles sont soit homofermentaires, soit hétérofermentaires. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes, leur température varie entre 25-53 °C, elles sont acidophiles (pH 5.5 - 6.2) .

Ce genre a été divisé en trois sous genres par Orla Jensen en 1919 ; *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium*, et cela en fonction de la température optimale de croissance et de la fermentation des sucres. Cette subdivision a été revue par (KANDLER et WEISS, 1986) ayant abandonné cette classification et la remplaçant par des sous genres sous forme de numéros.

⇒ **Groupe I** : *Lactobacillus* homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses par la voie d'Embden Meyerhof en produisant du lactate mais ne fermentent ni les pentoses ni le gluconate. Ce groupe contient les espèces les plus acidifiantes et les plus thermophiles (température 40-52 °C) .

⇒ **Groupe II** : *Lactobacillus* hétérotrophes facultatifs qui fermentent les hexoses par la voie d'Embden Meyerhof en produisant du lactate. Les espèces appartenant à ce groupe peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphocétolase inducible.

⇒ **Groupe III** : *Lactobacillus* hétérotrophes stricts qui fermentent les hexoses en produisant du lactate, acétate, CO₂, fermentent aussi les pentoses en lactate et acétate par une phosphocétolase.

Ces trois groupes sont chacun/formés de complexes qui se distinguent par leurs similarités génétiques, biochimiques ou physiologiques, (ROISSART et LUQUET, 1994). Le premier groupe est très recherché sur le plan technologique pour diriger la fermentation, baisser le pH des produits et pour sécuriser les produits fermentés contrairement aux deux autres groupes qui sont à l'origine des altérations. Les *Lactobacilles* de par leur variété sont présents dans des milieux très différents. Ils sont présents naturellement chez l'homme et l'animal et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal. Les *Lactobacillus* sont également naturellement présents dans les aliments tels que la viande et ses dérivés

ainsi que les produits laitiers. Dans l'environnement, on peut les rencontrer sur les végétaux, dans les eaux de surface et dans les eaux usées. Les espèces mésophiles *Lb. casei subsp. casei*; *Lb. plantarum*; *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* sont caractérisées par un large spectre de fermentation et sont présentes dans le lait et dans des fromages (BUSSON et al., 1996).

Ils sont utilisés industriellement dans trois domaines :

⇒ en tant que probiotiques dans l'alimentation animale.

⇒ dans les préparations pharmaceutiques destinées à l'homme.

⇒ en tant que ferments lactiques pour produits fermentés (dans les domaines laitiers et carnés).

2.4.1.2 Groupe *Lactobacillus delbrueckii*

Lactobacillus delbrueckii groupe comprend 33 species et subspecies ; *L. acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. indicus*, *L. delbrueckii subsp. jakobsenii*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. sunkii*, *L. equicursoris*, *L. fornicalis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gigeriorum*, *L. hamster*, *L. helveticus*, *L. hominis*, *L. iners*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. Kefirgranum*

2.4.1.3 Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* a été revu par (SARKAR et TAMANG, 1994) en vue d'accommoder les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Des études ont permis de transférer plus de cinq autres streptococcus du groupe D au genre *Enterococcus* (Schleifer et al. 1985).

Le genre *Enterococcus* comporte plus de 19 espèces. L'analyse des séquences de L' ARNr 16S a permis de démontrer que les *enterococcus* sont plus proches des *Carnobacterium* et *Vagococcus* que des *Streptococcus* et *Lactococcus*. Certaines caractéristiques de ce genre décrites par (BOUCHER et al., 2001) sont valables pour toutes les espèces d'*Enterococcus* et qui sont comme suit ; cellules à forme sphérique, Gram-positifs, disposées en simples, en paires ou en courtes chaînes ne formant pas d'endospores, peuvent être mobiles, anaérobies facultatifs et homofermentaires (DEVRIESE et POT, 1995).

2.4.1.4 Le genre *Streptococcus thermophilus*

Appartenant à la famille des Streptococcaceae, ce sont des bactéries sphériques, de diamètre qui varie entre 0,5 à 1 μm , leur mode d'association par paire. Cette espèce reste dans le genre *Streptococcus thermophilus* se distingue des autres *Streptococcus* lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43°C, l'absence de tout antigène de groupe, sa thermorésistance à 60°C (parfois 65°C) pendant 30 minutes (GARVIE, 1984). une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl (HARDIE, 1986).

Elles sont isolées à partir du lait chauffé à 45-50°C ou du lait pasteurisé et des produits laitiers (yaourt). Ils se retrouvent également dans le matériel de la laiterie et dans le vin. Elles ne sont jamais isolées dans d'autres habitats (CERNING et al., 1992). Elles ont en général des besoins complexes en facteurs de croissances, vitamine B, acides aminées, peptides, bases puriques et pyrimidiques (GUEVARA et JORGE, 2011). C'est une des raisons qui explique leur abondance dans un milieu aussi riche que le lait. Ces organismes ont un contenu en GC de 35-46 %.

2.5 Bactéries pathogènes

2.5.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter genre appartient à la famille Helicobacteriaceae, classe VI ARNr, division Epsilon dans les bactéries Gram-négatives ou Proteobacteria (VANDAMME et al., 1991). Il se développe dans des conditions microaérophiles (5% d'O₂, CO₂ 7%, 8% de H₂, 80% de N₂) à 30-37°C.

Le genre *Helicobacter* comprend 23 espèces de bactéries microaérophiles, étant *Helicobacter pylori* le plus étudié. Il a été détecté dans les matières fécales, de l'eau et des déchets, le lait, les boissons de légumes, et leur isolement est compliqué. Il est considéré comme étant résistant à la concentration de chlore et l'ozone utilisé dans la distribution de boisson de traitement de l'eau. Certaines études montrent que dans des conditions de stress environnemental de ces microorganismes peuvent entrer dans une phase viable mais non cultivable (VNC), le maintien des activités métaboliques et d'exprimer des facteurs de virulence. Les formes VNC dans les systèmes aquatiques peuvent rester pendant de longues périodes de temps, montrant les changements morphologiques lors du passage en hélice coccoïde, un mécanisme de survie dans l'environnement qui favorise la transmission (JIMÉNEZ-PEARSON et al., 2005). Nom de *Helicobacter* se réfère à sa morphologie hélicoïdale. Ce sont des bacilles spiraux, spirales, formes de S, V et U, courbes ou droites Rm 0,3-1,0

longue.(TABAK et DOUKANI KOULA, 2017).

Nous avons des extrémités arrondies et la périodicité spirale incurvée. A 6 flagelles, fil fourré, uni polaires, présentant des bornes de bulbes distinctifs et la paroi cellulaire lisse. Il est considéré que la gaine de fléau est adaptée pour vivre, se déplacer à travers la muqueuse et de protection contre l'acide gastrique (QUINTERO et al., 2005).Teneur en G + C varie de 35 à 44% en moles.

Au cours de la gélose d'infusion complétée avec du sang ou du cerveau du charbon originaire après 2-5 jours d'incubation à 37C colonies non pigmentées, diamètre translucide 1-2 mm, avec un léger convexe et hémolyse autour.

(GUETARNI et BENSOLTANE, 2013)ont cité que *H.pylori* est l'espèce type du genre et le plus important en pathologie humaine sa relation étroite avec la colonisation asymptomatique à une gastrite de production chronique, l'ulcère gastro-duodéal et le cancer gastrique dans certains cas, le lymphome de MALT et ulcère duodéal(THORBURN et al., 1998).

L'activité vacuolisante et cytotoxique de *H. pylori* varie entre les souches Interférer dans l'estomac et les processus physiologiques de protection duodénum(MONTEALEGRE et al., 2010).

L'OMS a classé cette bactérie comme une seule classe cancérogène. Le cancer gastrique a un taux de 70% de mortalité, occupe le deuxième rang après le cancer du poumon. Dans certains pays, il est la principale cause de décès chez les hommes et la troisième principale cause de décès chez les femmes (MEDOUAKH et al., 2010) . 25-50% de la population dans les pays développés est infecté par *H. pylori* et 80% dans la population des pays en développement (ORTIZ-PRINCZ et al., 2010).

D'autre part, elles influencent aussi la virulence de la souche pathogène, les aspects l'environnement, les conditions de l'hôte en tant que fond génétique, la réponse immunitaire, la réinfection, l'alimentation, la consommation d'alcool et la consommation de tabac à priser (YU et al., 2009). Elle se propage par le tube digestif d'une personne à personne (salive) ou fécale-orale route (De Cothi et al. 1989).

H. pylori est une bactérie qui est acquis pendant l'enfance, environ 80 à 90% des gens sont en contact avec les bactéries tout au long de sa vie. Être présents dans la muqueuse gastrique et des cellules tumorales génère une réponse immunitaire qui est incapable de tuer les bactéries. Des nitrites pour empêcher le développement de la gastrite, la consommation de légumes riches en antioxydants naturels et les saucisses est recommandé pour atténuer les effets néfastes qu'elle engendre dans un premier temps, dans des conditions in vitro, *H. pylori* isolée de la muqueuse gastrique de patients souffrant de gastrite et d'ulcères ont montré une sensibilité aux antibiotiques (HAWTIN et al., 1990),Comme l'ampicilline, la rifampicine, la gentami-

cine, l'amoxicilline, la pénicilline, l'érythromycine, tétracyclines et métronidazole et cimétidine résistance, ranitidine, famotidine, sulfamides, triméthoprime et résistance variable à l'acide nalidixique et de la céphalothine.

Les agents antimicrobiens tels que l'amoxicilline, la clarithromycine, sels de bismuth, Métronidazole ou tinidazole avec un inhibiteur de la pompe à protons (oméprazole), ou la ranitidine sont utilisées dans des combinaisons triples ou (USHIYAMA et al., 2003). Ces traitements guérissent entre 80-90 % des cas, mais ils sont coûteux (KODAMA et al., 2012).

Le traitement par métronidazole ou à la tétracycline sont des options dans l'éradication de souches clarithromycine-résistantes, leur utilisation clinique est limitée en raison des effets secondaires ou également la présence de souches résistantes à ces médicaments. Clarithromycine a un effet important sur l'infection à *H. pylori* par rapport à d'autres antibiotiques. Au moins 5 à 10% de *H. pylori* des souches résistantes à la (USHIYAMA et al., 2003).

Cet antibiotique est également utilisé pour lutter contre d'autres infections bactériennes telles que la pneumonie; ce qui peut contribuer en partie à l'émergence de bactéries résistantes à cet antibiotique. Il est considéré que *H. pylori* a acquis une résistance à la clarithromycine est due à une mutation de l'acide aminé (adénine-guanine) ou 2144 à 2143 dans le domaine V de l'acide ribonucléique dans le gène 23S. Le mécanisme de la pathogénicité de cette bactérie n'a pas été clairement expliqué. Les résultats de l'intérêt dans la réduction de l'utilisation d'antibiotiques et de chercher des solutions de rechange flatteur (HAMILTON-MILLER, 2003) (COUDEYRAS et FORESTIER, 2010).

Les dommages aigus induits par cet agent pathogène peut être empêchés par un prétraitement avec un probiotique. *H. pylori* en présence de substances dans le LAB modifie sa morphologie coccoïde hélicoïdale, les Souches de *Lactobacillus* ont la caractéristique particulière établie dans la muqueuse gastrique lorsque vous êtes blessé et exerce une fonction de régénération dans les processus de tissus (LIN et al., 2009). Même caractérisé par la capacité à inhiber la croissance de *H. pylori* des souches résistantes la suppression de la production d'IL-8, sans endommager les cellules de *H. pylori* clarithromycine. L'interleukine IL-8 est une cytokine puissante qui attire les neutrophiles et provoque une inflammation dans les tissus et joue un rôle important dans l'infection à *H. pylori*. Etant ladite souche-dépendante effet .

2.5.2 *Salmonella spp*

Il appartient à la famille des Enterobacteriaceae, Gram-négatives, anaérobies facultatives .c'est une bactérie pathogène, les fièvres entériques cause de gastro-entérite et la septicémie chez l'homme et peut affecter de nombreuses espèces animales. Le pourcentage de G + C est 50-53 % .Toutes les données phylogénétiques montrent que l'évolution du genre *Salmonella* est continue.

Les Classifications récentes reconnaissent deux espèces de *Salmonella*, dont l'un contient six sous-espèces. L'espèce type est la *Salmonella enterica* ou *Salmonella choleraesuis* (Furet et al. 2008).L'analyse du gène de l'ARNr 16S indique que *Salmonella* appartient à Gamma proteobacteria.

En outre, il a été découvert que *S. bongori* et *S. enterica* sont étroitement liées à *E. coli* et Shigella. Ils poussent bien dans les milieux de culture ordinaire sans nécessiter des facteurs essentiels et peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, 6,5 à 7,5 pH optimal NaCl sensible, mais a été trouvé dans la saumure avec 3,2% de sel. Le degré de croissance de *Salmonella* dépend du niveau de température, le pH, la salinité, l'activité de l'eau et des éléments nutritifs. La température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37, peut-multiplier 5-47 ° C Lorsque les aliments crus et cuits sont stockés à des températures inférieures à 10 ° C.Il a empêche leur croissance mais ne garantit pas la destruction de survie (WALTERS et al., 2005).

S. typhi est le seul serotype qui ne produit pas de gaz dans la fermentation des sucres réduite les nitrates en nitrites. La différenciation entre les espèces et sous-espèces est effectuée en tenant compte des différentes propriétés biochimiques. Non fermenter le lactose, sauf *Salmonella enterica subsp. arizonae* et *Salmonella enterica subsp. diarizonae* qui fermentent le glucose avec la production de gaz, ne produisent pas de l'indole ne dégrade pas l'urée pour décarboxyler ornithine et l'acide aminé Lysine (Flores Aguilar 2003).

Ils possèdent des antigènes somatiques, et certains sérotypes antigène flagellaire présent antigène capsulaire Vi appelé. Antigène O est un lipopolysaccharide thermostable, située dans la paroi cellulaire, qui est associé à une endotoxine et permet à la division des groupes de Salmonelles. L'antigène flagellaire H est thermolabile, protéinique et permet la répartition des espèces en monophasique (toujours avoir le même antigène flagellaire) ou biphasique (phase 1 et de phase 2). Antigène Vi ne possède certains sérotypes (typhi, paratyphi-C et Dublin). Il est un antigène capsulaire, thermolabile, responsable de la virulence conjointement avec l'antigène O. Comme les autres phages *Entérobactéries* et *Salmonella* peuvent contenir des plasmides peuvent coder certaine virulence et la résistance aux antibiotiques. Proche 5% des souches de *Salmonella* produisent des bactériocines actives contre *E. coli*,

Shigella et *Salmonella* (MITCHELL et al., 2001).

Salmonella spp, Il est un agent pathogène d'origine alimentaire et on reconnaît donc son importance dans la sécurité alimentaire et de la santé publique. Sérotypes de *Salmonella* peuvent être strictement adaptés à un hôte particulier et retrouvé dans un grand nombre d'espèces animales. Sérotypes la plupart des animaux sont adaptés à Typha, Paratyphi A et Sendai qui causent généralement des maladies graves telles que la septicémie. Le sérotype Abortusovis est la principale cause de l'avortement chez les moutons et Typhisus sérotype gallinarum se produit chez les porcs et les volailles respectivement (ORTIZ-PRINCZ et al., 2010).

La salmonellose est transmise de personne à personne, par la pollution l'eau fécale et de la nourriture. Des doses infectantes moins de 10³ sont suffisantes pour provoquer des symptômes cliniques tels que la typhoïde, la septicémie ou une infection asymptomatique légère. L'incidence est plus élevée dans les pays avec une mauvaise hygiène. La fièvre typhoïde, une infection systémique causée par le sérotype *Typha* est d'intérêt public.

L'OMS estime que plus de 16,6 millions de cas de typhoïde chaque année causant 600.000 décès par an. Le *Salmonella enterica* est divisée en six sous-espèces. I. *enterica*. II. *Salamae*. III a. *Arizonae*. IIIb. *Diarizonae*. IV. *Houtenae*. V. *bongori*. VI. *Indica*. Chaque sous-espèce est composée de différents sérotypes. La souche de type a un plasmide de virulence associée à 90 kb. Le pourcentage en G + C est de 50 à 53% (KRIEG et HOLT, 1984). Il a été démontré que *S. enteritidis* attaque de l'iléon et le côlon à moindre mesure (DE LEBLANC et al., 2010). Le *Salmonella enterica subsp enterica*, a été isolé à partir de sang humain et de l'animal chaud par la consommation d'oufs contaminés de poulet et de produits de volaille (ZARAI et al., 2010). Les sérotypes enteritidis et stand typhimurium qui causent souvent des infections chez les humains et les animaux. Les deux liés dans les cas de gastro-entérite dans la Man (KRIEG et HOLT, 1984).

S. typhimurium provoque la fièvre typhoïde et les infections systémiques chez les êtres vivants sensibles associées à de multiples blessures, la mort entérocolite d'organes chez les humains (DE LEBLANC et al., 2010). Elle adhère aux cellules épithéliales de l'intestin grêle, et à travers les muqueuses intestinales. Une fois dans la sous-muqueuse multiplie provoquant une réaction inflammatoire qui se traduit par une diarrhée. Dans le cas contraire enlevée par le péristaltisme intestinal, elles produisent une endotoxine qui est responsable de l'altération de la muqueuse intestinale (ISHIKAWA et al., 2010).

Les infections causées par des souches de *Salmonella* peuvent être traitées avec fluoroquinolones comme la ciprofloxacine, chloramphénicol, céphalosporines ouspectre

triméthoprime / sulfaméthoxazole (JORDAN et al., 2006).

De nombreuses études ont démontré que bactéries probiotiques viables sont employées comme alternative à un traitement antibiotique. Certaines souches de *Lactobacillus* se sont avérées efficaces dans la stimulation des plaques de Peyer pour produire des quantités élevées d'IgA, protégeant des bactéries pathogènes (ISHIKAWA et al., 2010) comme *Salmonella Enteritidis*, *S. enterica* et *S. typhimurium*. Les espèces *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* et *L. rhamnosus* ont été efficaces dans le traitement le traitement prophylactique de la diarrhée chez les enfants causées par *Salmonella* et ont augmenté l'immunité (MATYAR et al., 2008).

Le principal mécanisme d'action est le faible pH du milieu en raison de la production lactique à des concentrations de 20 à 40 mM d'acide, qui joue le rôle de perméateur la membrane externe des bactéries Gram négatif pathogènes augmentant ainsi la sensibilité aux molécules antimicrobiennes permettant d'entrer des bactéries (PA-TEL et al., 2012).

En outre, la production d'acides organiques, des bactériocines, l'acide lactique et de différentes molécules augmentant la sécrétion d'IgA produites dans la surface muqueuse contribuent à accueillir l'adhérence de la défense des pathogènes entériques renforçant l'immunité intestinale. Nous pouvons dire que les mécanismes de l'activité antibactérienne des probiotiques *Lactobacillus* semble être multi factorielle (BEJAR et al., 2011).

2.6 Identification de LAB

L'identification taxonomique comprend des paramètres phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour la classification des bactéries. L'utilisation appropriée des informations obtenues à partir de ces techniques est essentielle pour le bon regroupement des organismes dans un taxon donné (GARABAL et al., 2008).

Identification polyphasés de caractérisation fournissent un système d'identification haut fiabilité

2.6.1 Caractérisation phénotypique de LAB

Ce sont des méthodes classiques d'identification basées sur la relation phylogénétiques entre une série de caractère exprimées par les souches étudiées. L'étude de ces propriétés ont une validité prédictive élevée et représentent une petite partie d'infor-

mation génétiques ou l'expression est influencée par des facteurs environnementaux. Ce type d'identification implique les caractères des culture , morphologiques, physiologiques, biochimiques.

2.6.1.1 Caractères biochimiques

L'identification des souches par fermentation des sucres est particulièrement importante pour différencier les souches. Mais parmi les inconvénients de ce caractère il offre des résultats parfois ambigus(DROSINOS et al., 2007).

Différentes réponses parmi les souches appartenant à la même espèce affecte la mauvaise reproductibilité entre les laboratoires (SARANTINOPOULOS et al., 2001).

Dans la voie LAB, le lactose est le plus étudié et la capacité de fermentation varie selon les espèces lactiques.

2.7 Caractérisation génotypique de LAB

2.7.1 La PCR

La PCR est une technique de Biologie Moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis. C'est une technique d'amplification génique, c'est à dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement. Auparavant, une telle opération passait nécessairement par le clonage de la séquence, son isolement, son amplification dans une cellule hôte et sa purification. Cette méthode extrêmement lourde et longue a été abandonnée au profit de la PCR qui a certainement connu un développement spectaculaire et plus rapide dans l'histoire de la Biologie. En effet à moins de 3 ans après sa mise au point, tous les laboratoires de biologie moléculaire l'utilisaient.

2.7.1.1 Le principe

Principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce. Les acteurs qui interviennent en PCR sont :

- 1- l'ADN généralement sous forme double-brin, contenant le fragment à amplifier.
- 2- deux amorces, sens et anti-sens : ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

3- une enzyme : la Taq Polymerase (Taq Pol), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C ; ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

4- les 4 nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) qui sont les éléments de bases utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

2.7.1.2 Hybridation de l'ADN

est un paramètre indirect à savoir la similitude entre les génomes deux microorganismes différents, importants dans le groupe d'espèces (GARABAL et al., 2008). Il a été largement utilisé dans l'étude de la taxonomie de *Lactobacillus*. Souvent, l'hybridation est limitée par les souches de type d'un petit groupe d'espèces étroitement liées. Les problèmes surviennent lorsque les souches sont phénotypiquement identiques et des valeurs d'association sont égales ou inférieures à 70% (POT et al., 2009).

2.7.1.3 Les gènes 16S/23S d'ARNr

Le ribosome bactérien est composé de deux sous-unités 30S et 50S, la Sous-unité 30S contient molécule ARNr 16S et la sous-unité 50S contient 23S et ARNr 5S. Fragments 5S, 16 S et 23 S ont été utilisés dans les études phylogénétiques, 16S étant le plus approprié dans l'étude des procaryotes avec environ 1550 paires de bases (SARMIENTO, 2008) .

Les gènes de rARN 16S et 23S contiennent les séquences variables et hypervariables. Ribopatrones dérivés des tests d'hybridation 16S ARNr particulières de espèces étant efficace pour identifier *Lactobacillus* (SALAZAR et al., 2009).

Actuellement, le séquençage du gène 16S est le plus puissant et fiable dans les études sur les relations phylogénétiques entre outil de bactéries. Cette molécule a d'excellentes propriétés pour sa présence universelle. Il peut être séquence en utilisant des amorces universelles pour la PCR des régions conservées des deux côtés du gène.

Il est amplifié et séquencé par rapport aux séquences stockées dans des bases de données. Cela favorise la caractérisation des isolats inconnus et fournit des informations sur la position phylogénétique, qui renforce le succès de la technique. Une fois que la séquence est obtenue, elle peut être alignée et calculée la similarité (POT et TSAKALIDOU, 2009).

Des nombreuses espèces de LAB ont été totalement ou partiellement décrites par

cette technique. Les arbres phylogénétiques de ces bactéries sont hétérogènes, montrer une certaine proximité existant entre les espèces de *Lactobacillus* et *Pediococcus* et confirme les différences dans le contenu de G + C dans le genre.

L'inconvénient de cette technique est que la molécule, ainsi conservée offre une résolution aux espèces et sous-espèces. Par conséquent, les différentes espèces de séquences identiques partagées LAB 16S. En fait, certains *Lactobacillus* ont été renommés récemment. Bien que d'autres espèces, il y a suffisamment de différences phénotypiques et génotypiques qui facilitent l'identification (POT et TSAKALIDOU, 2009).

2.7.1.4 Séquençage du gène de ménage

est un outil prometteur pour les études phylogénétiques commandant la multilocus sequence typing (MLST de multilocus sequence typing), avec le séquençage d'au moins 5 gènes situés dans différentes parties du chromosome. *Lactobacillus* ont été utilisés dans les gènes *recA*, *cpn60*, *tuf* et *pnm*. Le plus intéressant de cette technique est l'obtention d'arbres phylogénétiques obtenus à partir de différents gènes de ménage (POT et TSAKALIDOU, 2009).

Un fragment du gène *recA* est présent dans des bactéries et est bien préservée. Les relations phylogénétiques obtenues correspondent bien à l'analyse du gène de l'ARNr entier. Il est un outil précieux pour l'analyse comparative des isolats humains et de la nourriture pour sa rapidité et sa facilité (LJUNGH et WADSTROM, 2006).

2.8 Les techniques basées sur la PCR

2.8.1 Amplified Polymorphism analyse (AFLP)

Cette analyse est basée sur la détection de polymorphismes par PCR à partir de tout échantillon d'ADN, quelle que soit leur origine ou leur complexité. Polymorphismes sont détectés par la présence ou l'absence de fragments de restriction obtenus par digestion d'ADN et sont ensuite amplifiés par PCR. Il analyse l'ensemble du génome bactérien, aucune connaissance préalable de la séquence génomique d'échantillons est nécessaire. Cette technique est facile à réaliser, discriminatoire et reproductible lorsque les conditions de digestion, liés et l'amplification des échantillons ne changent pas. Bien qu'il ne soit sensible à la qualité de l'échantillon d'ADN. Il est fiable et fournit des informations sur les espèces (POT et TSAKALIDOU, 2009)et

il fournit des informations limitées sur le génome complet (MCLEOD et al., 2008).

2.8.2 La restriction de l'ADN amplifié par une enzyme de restriction (RFLP)

A partir d'une séquence connue d'ADN génomique par PCR en utilisant deux amorces homologues à leurs zones d'extrémité, suivie d'une digestion amplifiée par une endonucléase de restriction et comparaison ultérieure des différents modèles de bandes de restriction obtenus. Il est intra-reproductible et la méthodologie d'analyse inter-laboratoire se révèle être compliquée et fournit des informations limitées, car une partie du génome est analysé (COLLADO et al., 2014) .

2.8.3 Amplification d'ADN par des amorces aléatoires, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

C'est une méthode simple à base d'acides nucléiques consiste à détecter les différences dans la séquence d'ADN génomique total de différentes souches, les régions amplifiées des séquences d'ADN aléatoires ont conduit à laquelle elles sont capables de se lier amorces séquence aléatoire unique. La séquence d'amorce n'a pas d'homologie connue avec l'ADN cible génère des fragments de différentes tailles qui peuvent être vus sur un gel d'agarose. Il est nécessaire de connaître préalablement la séquence de l'échantillon, il peut être utilisé avec une variété d'espèces est plus rapide que d'autres méthodes de typage. Il a une faible reproductibilité inter laboratoires. Le motif de bandes obtenu en certaines conditions ne sont pas toujours constante. c'est une technique qui se différencie de niveau souche et est utile dans le suivi des souches industrielles au sein des groupes spécifiques (COLLADO et al., 2014).

Il est un outil qui détecte la variabilité dans l'ensemble du génome bactérien, il est fiable pour l'identification, la caractérisation des aliments de LAB et les souches *Lactobacillus* augmentations de puissance discriminantes lorsqu'il est combiné avec d'autres techniques à l'aide de différents initiateurs (MARTÍN-PLATERO et al., 2009) Bien qu'il soit plus précis que d'autres techniques de dactylographie, fournit des informations limitées sur le génome Complet (MCLEOD et al., 2008) (McLeod, 2008), et moins reproductible que REP-PCR permettant la construction de bases de données pour un laboratoire de référence unique (POT et TSAKALIDOU, 2009).

2.8.4 REP (Répétitif extragénique palindromique), ERIC-PCR, GTG5-PCR, Box-PCR

Ces techniques ont en commun le fait qu'elles soient faciles à réaliser et ne nécessitent pas beaucoup de matériel de laboratoire trop. Les matrices d'identification à l'aide augmentent à mesure que les séquences du génome sont disponibles. Ces matrices peuvent impliquer des gènes de fonctionnalité avec des marqueurs taxonomiques. La combinaison de plusieurs marqueurs fournit des systèmes de classification et d'identification fiables. La disponibilité des plates-formes de séquençage à haut débit pour accélérer le processus de collecte des connaissances du bactéries lactiques et la disponibilité d'un grand nombre de séquences chromosomiques peuvent aussi fournir la clarté par exemple, le transfert de gènes (POT et TSAKALIDOU, 2009) . L'identification à l'aide de matrices qui augmentent les séquences du génome sont disponibles. Ces matrices peuvent impliquer fonctionnalité gènes avec des marqueurs taxonomiques. La combinaison de plusieurs marqueurs fournir des systèmes de classification et d'identification fiables. Disponibilité plates-formes de séquençage à haut débit pour accélérer le processus de collecte des bactéries lactiques et la connaissance de la disponibilité d'un grand nombre de séquences Chromosomal peut également fournir une clarté par exemple, dans le transfert de gène (POT et TSAKALIDOU, 2009).

2.9 Les probiotiques

2.9.1 Définition

Les probiotiques sont des microbes vivants qui peuvent être intégrés dans différents types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments alimentaires. Les espèces de *Lactobacillus*, figure(2.2)et *Bifidobacterium* sont les plus communément utilisées comme probiotiques, mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* et quelques espèces de *E. coli* et de *Bacillus* sont également utilisées comme probiotiques.

Les bactéries lactiques, y compris des espèces de *Lactobacillus*, utilisées pour la conservation de la nourriture par fermentation depuis des milliers d'années, peuvent jouer un double rôle comme agents de la fermentation alimentaire et comme agents bénéfiques pour la santé, cependant, le terme « probiotique » devrait être réservé aux microbes vivants pour lesquels un bénéfice pour la santé a été démontré dans des études contrôlées. La fermentation des aliments leur donne un goût particulier

et diminue le pH, ce qui empêche la contamination par de agents pathogènes potentiels.

La fermentation concerne globalement un vaste ensemble de produits agricoles (céréales, racines, tubercules, fruits, légumes, lait, viande, poissons, etc.).

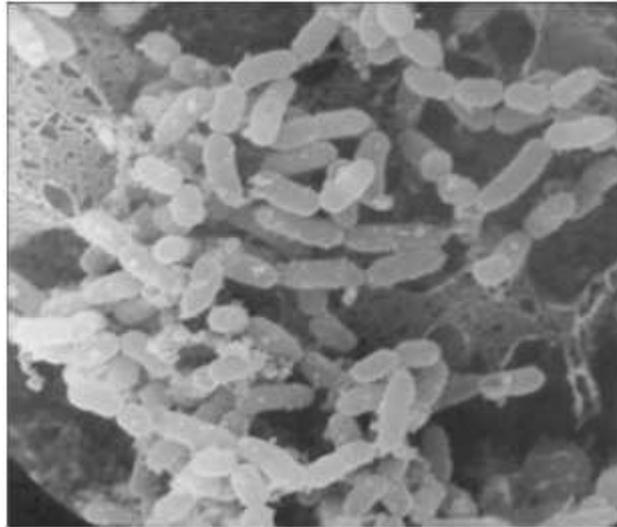


FIGURE 2.2: Photographie de microscopie électronique à balayage de *Lactobacillus salivarius* adhérant à des cellules Caco-2.

2.9.2 L'effet bénéfique pour la santé

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. Quelques préparations de probiotiques ont été utilisées pour prévenir la diarrhée due aux antibiotiques, ou comme traitement contre une dysbiose (déséquilibre au niveau de la flore bactérienne) liée aux antibiotiques. Des études ont documenté démontré les effets des probiotiques sur un grand nombre de troubles gastro-intestinaux et extra intestinaux, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD/MICI), le syndrome de l'intestin irritable (IBS), les infections vaginales et sur une stimulation du système immunitaire. Quelques probiotiques ont montré un effet positif sur la survie des nouveau-nés prématurés. On a aussi cherché à connaître les effets des probiotiques sur l'eczéma atopique et les complications liées à la cirrhose du foie. Bien qu'il y ait quelques évidences cliniques du rôle des probiotiques sur la diminution du taux de cholestérol, cela reste encore controversé.

En général, les meilleures preuves cliniques en faveur des probiotiques concernent leur utilisation pour améliorer la « santé intestinale » (gut health) et stimuler la fonction immunitaire, tableau (2.2).

TABLE 2.2: de souches de probiotiques dans des produits

Souches (désignations alternatives)	Nom commercial	Fabricant
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen	Yakult
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Procter et Gamble
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Bifido Danisco
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru	Morinaga Milk Industry
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel	Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431	DanActive	Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult

2.9.3 Effets Nutritionnels

Parmi ceux mis en examen de la consommation de probiotiques dans des produits laitiers les avantages nutritionnels sont l'absorption des minéraux tels que le calcium, le zinc, le fer, le manganèse, le cuivre et le phosphore . De même, l' action microbienne augmente la digestibilité des protéines du yaourt et la biodisponibilité des vitamines telles que la riboflavine, ce qui rend ces nutriments plus facilement utilisables (ORTEGA et al., 2002).

La consommation de bactéries probiotiques contribue également, par la production d'enzymes spécifiques, l'utilisation d'autres substances nutritives dans l'intestin (CUMMINGS et al., 2001).

En raison de la capacité de déconjugaison des sels biliaires qui possèdent certaines de ces bactéries, il a été postulé que les probiotiques peuvent stimuler le catabolisme du cholestérol abaissant la cholestérolémie (PEREIRA et al., 2002).

2.9.4 Immunomodulation

Le microbiote intestinal normal à travers le contact et l'interaction avec le tissu lymphoïde de la muqueuse intestinale joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire compétent (GHOSH et al., 2006).

La nature immunomodulatrice des probiotiques se réfère à un large éventail d'effets sur l'immunité cellulaire et humorale (BORRUEL et al., 2003). Certains probiotiques sont capables d'augmenter l'immunité innée, par exemple en augmentant la capacité phagocytaire (DONNET-HUGHES et al., 1999).

En outre, décrit que les probiotiques peuvent produire une stimulation de l'immunité acquise ou spécifique induisant la production d'immunoglobulines spécifiques de type A, qui sont les muqueuses défense (PERDIGON et al., 2002).

Dans d'autres états pathologiques il est prouvé que les probiotiques peuvent induire des effets opposés, tels que l'inhibition de réactions d'hypersensibilité ou d'une réduction de l'allergie (KALLIOMÄKI et al., 2001) .

2.9.5 Effets thérapeutiques

Parmi les avantages thérapeutiques attribués aux probiotiques, les mieux documentés comprennent la digestion des personnes intolérantes au lactose amélioré ,ce disaccharide, l'inhibition des agents pathogènes dans l'intestin et le traitement et la prévention de la diarrhée (SALMINEN et VON WRIGHT, 2004).

Une grande partie de la population mondiale a de faibles niveaux de lactase (*B* galactosidase) dans la muqueuse intestinale. Les personnes atteintes de cette déficience de ne pas absorber le lactose dans l'intestin grêle et du côlon provoque la fermentation et des nuisances diverses. Les bactéries du yaourt ont les enzymes nécessaires à la digestion du lactose, de sorte que de nombreuses études ont démontré l'efficacité de la consommation de yaourt et d'autres probiotiques dans le traitement des symptômes de ce dysfonctionnement de l'intestin (STANTON et al., 2003) .

Grâce à des essais cliniques, il a également été démontré que les probiotiques sont d'utilité dans la prévention et le traitement de divers types de diarrhée. Les travaux publiés concernent principalement le rotavirus de la diarrhée infantile (SALMINEN et al., 1998), mais il a également été démontré une réduction de la fréquence et la durée des autres diarrhées infectieuses, y compris la diarrhée du voyageur ou de la diarrhée associée à un traitement antibiotique (CAGLAR et al., 2005).

Récemment, études ont été menés sur les probiotique et le traitement d'autres troubles intestinaux tels que les maladies inflammatoires (maladie de Crohn et la co-

lite ulcéreuse)(OUWEHAND et al., 2002),le cancer colorectal ou la gastrite chronique et des ulcères gastriques causés par *H. pylori* (SHEU et al., 2002).

2.10 Critères de sélection des LAB probiotiques.

Quel que soit le type de micro-organisme à utiliser comme probiotique, un certain nombre d'exigences doivent être remplies et évaluée individuellement dans chaque souche. La base théorique de la sélection de bactéries probiotiques comprennent des aspects de sécurité, les critères fonctionnels et les critères technologiques(SANDERS et HUIS, 1999) .

Récemment (Reuter et al. 2002) ont établi que, pour assurer la qualité des aliments contenant des micro-organismes probiotiques, les cultures bactériennes doivent remplir les conditions suivantes :

- 1- Démontrer un effet bénéfique sur la santé
- 2- Atteindre l'intestin humain dans un état viable et à une concentration appropriée, pour ce qui doit résister à des souches barrières TGI.
- 3- Restent viables en quantité suffisante pendant toute la durée de vie utile du produit dans lequel elles sont incluses. Les souches doivent conserver leurs propriétés pendant les étapes de la production, la distribution et le stockage.
- 4-Aussi un élément important à considérer dans le choix des probiotiques est l'origine de la souche. L'origine humaine de la souche est souhaitable parce que l'interaction entre les bactéries et l'hôte est une fréquence spécifique. Bien qu'il existe des micro-organismes probiotiques provenant d'autres sources, le plus de succès ont été testés sont de source humaine (SALMINEN et VON WRIGHT, 2004).

2.11 Sécurité d'utilisation

LAB sont généralement considérés comme des bactéries GRAS pour la consommation humaine, à travers l'histoire ont été présents dans de nombreux aliments fermentés. Cependant, on ne peut pas supposer que toutes les souches partagent le même dossier de sécurité. En outre, au cours des dernières années on note une augmentation le nombre de cas d'infections qui sont des micro-organismes isolés appartenant au groupe de LAB, y compris certains probiotiques (JUAN et ANTONIO, 2013).

Pour cette raison, la sécurité doit être vérifiée individuellement, en veillant à ce que chaque souche probiotique est exempte de facteurs de virulence et les détermi-

nants de la pathogénicité. Il est également important d'évaluer la présence d'activités enzymatiques nuisibles pour l'hôte et l'absence de résistance aux antibiotiques transférables (ISHIBASHI et YAMAZAKI, 2001).

2.12 Critères fonctionnels

Des micro-organismes probiotiques prennent effet sur la santé de l'hôte, s'ils sont en mesure d'atteindre, de survivre et de s'implanter ou de demeurer viable pendant un certain temps dans l'intestin. Critères fonctionnels se rapportent aux propriétés biologiques et les caractéristiques des souches probiotiques et comprennent des éléments de résistance au transit gastro-intestinal et de la survie dans le site d'action.

2.12.1 Résistance au transit gastro-intestinal

Des micro-organismes probiotiques passant à travers le TGI doivent résister à des brûlures d'estomac et du pancréas par la présence gastrique et des enzymes et des sels biliaires intestinaux qui présentent une activité antibactérienne significative. Ces qualités peuvent être évaluées par une simple *in vitro* ou par des modèles plus complexes dans lesquels le processus dynamique est simulée des essais de digestion (MARTEAU et al., 1997).

2.12.2 Survie dans le site d'action

La survie et la persistance dans l'intestin des probiotiques dépend en grande partie des mécanismes d'exclusion compétitive ayant des souches et comprennent entre autres l'adhésivité à l'épithélium intestinal et une activité antimicrobienne. Une fois que le micro-organisme a atteint sa destination doit être en mesure d'adhérer aux cellules de la muqueuse intestinale et éviter d'être éliminés par les sécrétions et le péristaltisme. Les mécanismes médiateur traite adhérence ne sont pas entièrement clarifiés et semblent être différents. Exopolysaccharides, protéines et acides lipotéchoïques de la surface cellulaire sont certains des facteurs qui pourraient être impliqués dans l'adhésion (GRANATO et al., 2004).

Les probiotiques peuvent exercer une activité antimicrobienne sur un micro-organisme ou d'un groupe spécifique de micro-organismes. Cette activité peut être due à la concurrence pour les éléments nutritifs, des sites de liaison à l'intestin ou à la production de substances antimicrobiennes.

De nombreux métabolites produits par des laboratoires ont une activité antimicrobienne, tels que les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique actifs contre les micro-organismes sont étroitement liées à la production d'espèces (CLEVELAND et al., 2001).

2.12.3 Critères technologiques

Les aspects technologiques qui sont évalués dans la recherche et la sélection des probiotiques peuvent être très variables et dépendent de la forme de la production et la fourniture du produit. Dans tous les cas, le probiotique doit être facilement cultivable et en maintenant des niveaux élevés de viabilité et de stabilité de ses propriétés dans le produit. Certains des facteurs qui influent sur la stabilité pendant le traitement et le stockage sont : la température, l'acidité et la composition du produit (SANDERS et ELLEN, 2000).

Les souches résistantes à la congélation et la lyophilisation sont également importantes pour le développement de cultures industrielles caractéristiques. Dans le cas de son application dans les produits laitiers, il doit tenir compte de la compatibilité avec les cultures starter, car la plupart des micro-organismes probiotiques ne peuvent pas être utilisés comme ferments (EMBALÓ, 2014) .

La tolérance à l'oxygène et la résistance aux bacteriophages peuvent également être des facteurs importants. Il est en outre souhaitable que les micro-organismes confèrent au produit des qualités organoleptiques agréables (CRITTENDEN et al., 2002).

2.13 Les bactériocines

2.13.1 Définition

En tant que groupe, bactériocines partagent un certain nombre de caractéristiques. Des études approfondies sur les colicins produites par les bactéries Gram négatif ont suggéré six critères pour caractériser les protéines antimicrobiennes produites par des microorganismes Gram-positifs (TAGG et al., 1976).

Bien que les études sur les protéines antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques citent fréquemment ces critères, la lecture plus approfondie révèle que ceux-ci ne devraient pas être utilisés comme critères rigides pour les organismes

Gram-positifs (KLAENHAMMER, 1993).

Il est devenu de plus en plus clair que peu de protéines antimicrobiennes conviennent à tous les six critères. Ainsi, chacun des six critères est considéré séparément ci-dessous.

Les bactériocines doivent être des protéines. Ceci est une caractéristique absolue de bactériocines et habituellement mise en évidence par la protéase négation de l'antimicrobien de la bactériocine putative bactériocines antimicrobien activité.

Cependant, étant donné que les peptides peuvent également être inactivés par des protéases, il y a un débat sur la taille d'un peptide doit être avant qu'il ne devienne une protéine. Est-ce que, par exemple, le décapeptide Gramacidin une protéine.

Nous suggérons que si le polymère est fait ribosomal via la transcription d'un gène unique qui est ensuite traduit en protéine, alors il est une protéine. Cependant, si le polymère est préparé par voie enzymatique par la condensation d'acides aminés (comme cela est le cas pour Gramacidin), il doit être considéré comme un peptide. Dans le cas des molécules plus grandes, l'inactivation de l'activité de la bactériocine par un ou plusieurs protéases est une preuve suffisante que d'un inhibiteur microbien est protéiniques et, par conséquent, une bactériocine. Synthèse des protéines les inhibiteurs devraient être utilisés pour déterminer si petite amino les polymères acides sont des protéines ou des peptides.

Les critères suggèrent que les bactériocines sont bactéricides, non seulement bactériostatique. Alors que les caractérisations initiales ont suggéré que beaucoup de bactériocines sont bactéricides, dès 1977 Lipinska a noté que la nisine est un antimicrobien faible et est sporostatiques ou bactériostatique. De nombreux bactériocines initialement caractérisées comme bactéricide dans des systèmes modèles ont été montrés plus tard être statiques dans des applications alimentaires (GUETARNI et BENSOLTANE, 2013) .

Les inhibiteurs inhibent la croissance des agents pathogènes sans tuer, et le mode statique ou bactéricide d'action est souvent une fonction du système à l'étude plutôt qu'une inhérente caractéristique de la molécule, ce critère ne soit pas essentiel à la définition des bactériocines.

2.13.2 Nomenclature

La nomenclature de bactériocine est simple. Tout comme "ase" est utilisé dans la nomenclature des enzymes, le suffixe «Cin» est utilisée pour désigner l'activité bactériocinogenic. Le suffixe "cin" est ajouté soit au nom de genre ou (plus correctement)

au nom de l'espèce. Les colicines ont été initialement isolé à partir d'*Escherichia coli*, "monocins" sont des protéines antimicrobiennes faites par *Listeria monocytogenes*, la subtiline est produite par *Bacillus subtilis*, staphylocin par *Staphylococcus aureus*, et ainsi de suite. Les lettres successives attribuées dans l'ordre de la découverte sont utilisées après le nom bactériocine pour différencier les bactériocines uniques produites par différentes souches de la même espèce. Par exemple, lactacin F était le sixième bactériocine rapporté pour une espèce lactobacilles.

2.13.3 Classes bactériocines

Les bactériocines peuvent être regroupées en quatre classes distinctes.

Classe I : Se compose de lantibiotiques large spectre de bas poids moléculaire et de modifications post-traductionnelles ; de ceux-ci le plus représentatif est la nisine.

Classe II : Comprend thermodurcissables faibles peptides de poids moléculaire sans modification, dont la principale caractéristique est l'activité antilisterial (NAGHMOUCHI et al., 2007).

Classe III :Peptides groupes de plus thermolabile comme helveticine (TJAKKO et al., 1995).

Classe IV :Est composé de molécules complexes avec lipidique et glucidique fractions (PAPAGIANNI et ANASTASIADOU, 2009), le tableau (2.3) est présenté quelques bactériocines appartenant à ces classes.

2.13.4 Présence des bactériocines

Les protéines antimicrobiennes sont produites par de nombreux pathogènes et genres non pathogène, tableau (2.4). La proportion des souches produisant des bactériocines examinées dans un genre donné comprise entre 1 et 100%. Rapports de 100% l'incidence devrait être soigneusement examiné pour assurer que des contrôles adéquats ont été exécutés d'exclure la possibilité de l'inhibition due à l'acide, de l'hydrogèneperoxyde, ou bactériophage.

(KALMOKOFF et al., 1999) a rapporté que listeriocins sont produites par 75% des souches de *Listeria*.

et

ont rapporté aussi que seulement 5% des streptocoques lactiques (Maintenant classé comme lactocoques) produisent bactériocines.

(LIPUMA et al., 1990) ont rapporté que 4% d'Hémophiles influenzaproduire des bactériocines.

TABLE 2.3: Bactériocines représentatifs produits par LTA (Adapté de la Colline 1995).

Bactériocines	Producteur	Spectre d'inhibition	Taille (nombre d'acides aminés)
Classe I : lantibiotiques			
Nisine (A et Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Grand	34
lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Grand	27
lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i>	grand	37
carnosine U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Grand	35-37
Classe II : No lantibiotiques, thermostables			
lactococcine A	<i>Lactococcus lactis</i>	Etroitement	54
Lactococcine B	<i>Lactococcus lactis</i>	Etroitement	47
Lactacine F	<i>Lactobacillus johsonii</i>	Etroitement	57-48
plantaricine	<i>Lactobacillus planctarum</i>	Grand	34
Classe III :Agrandir, thermolabile			
Helveticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	étroitement	333
Classe IV : Molécules complexes			
Circularine A	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	76

2.13.5 Mode d'action des bactériocines

L'action des bactériocines est basée par la détermination de la composition de la membrane cytoplasmique, la structure et l'expression d'une protéine en fonction de l'immunité pour d'autres et la composition chimique de l'environnement (MENAD et al., 2012).

Récemment, on considère aussi l'existence de molécules de surface dans la membrane de la cellule cible pour permettre un couplage avec la bactériocine produite par d'autres bactéries (KEMPERMAN et al., 2003).

Les bactéries Gram-positives sont caractérisées par une teneur élevée en lipides dans les membranes anioniques, dans ce cas, le mode d'action des bactériocines est la membrane bactérienne initiale par attraction électrostatique entre les lipides chargés négativement et bactériocines avec charge nette positive localisée à une extrémité (C-terminale de la nisine N-terminal pédiocine) union ; après l'insertion de bactériocines produites dans la double couche lipidique dans le cas de la nisine cette insertion

TABLE 2.4: Les genres bactériens qui produisent les bactériocines

Les genres bactériens		
<i>Acetobacter</i>	Haemophilus	<i>Salmonella</i>
<i>Actinobacillus</i>	Haemophilus	<i>Propionibacterium</i>
<i>Brevibacterium</i>	Haloferax	
<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Serratia</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Listeria</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Leuconostoc</i>	Streptococcus
<i>Corynebacterium</i>	<i>Pediococcus</i>	
<i>Enterococcus</i>	<i>Erwinia</i>	

est réalisée à son extrémité N-terminale (MOLL et al., 1999) , et dans le cas de la pédiocine, par leur hélice a transmembranaire C-terminale (ENNAHAR et al., 2000). Ainsi des pores sont formés dans la membrane bactérienne, qui est perméabilisés, la cellule commence à perdre des ions et des métabolites de base pour leur survie et la mort éventuellement bactérienne se produit (très probablement due à vesiculation de protoplasme, la formation de pores et une désintégration complète de la cellule (BIZANI et al., 2005). Un autre aspect important est l'inhibition de l'ADN

biosynthèse conduisant à la mort cellulaire, comme un mécanisme secondaire de ces peptides antimicrobiens (BRÖTZ et SAHL, 2000).

Les bactériocines de puissance qui exercent sur d'autres micro-organismes pathogènes auront des comportements différents, à savoir, certains micro-organismes peuvent être sensibles, tandis que d'autres sont résistants à l'action de ces composés, y compris une souche qui semble être sensible peut avoir des cellules qui présentant une résistance à l'action de la bactériocine. De ces mêmes organismes certains peuvent être sensibles et résistantes à l'autre, les mêmes bactéries produisant des composés antimicrobiens peuvent être sensibles à l'action d'une autre bactériocine et enfin, des cellules de spores résistantes à ces substances peuvent devenir sensibles, après sporulation (TABAK et BENSOLATANE, 2015).

Le champ d'action des bactériocines est liée à la teneur en cystine et, par conséquent, trois groupes sont établis :

- a) bactériocines avec une gamme étroite d'action, limitée aux micro-organismes de la même espèce.
- b) bactériocines avec une plage intermédiaire qui empêche les bactéries d'acide lactique et certaines bactéries Gram-positives
- c) bactéricides avec une large gamme d'action, qui inhibent une grande variété de bactéries Gram-positif (CINTAS et al., 2001).

2.13.6 Production et la purification des bactériocines

La détection de souches productrices de bactériocines est très importante car elle permettra de poursuivre des études qui peuvent établir leur potentiel dans la gestion et le contrôle des processus infectieux. Cependant cela n'est pas facile et nécessite plusieurs méthodologie pour identifier, produire et purifier ces substances étapes. Des études sont nécessaires production et comptage avec de grandes proportions de cultures avant à partir de la purification. La production de certaines bactériocines peuvent être favorisées sous certaines conditions de croissance. Par exemple, les conditions d'incubation, telle que la température et le pH . donc, les conditions la production doit être spécifique pour chaque organisme producteur (DOSTA et al., 2009) .

La composition du milieu de croissance a affecte également la production de ces substances (STOTT et al., 2016).

En général les milieux complexes contenant une source riche en azote sont optimales pour augmenter la production de bactériocines (KAWAI et al., 2004).

Il est important de choisir un moyen de croissance correcte car cela pourrait interférer ou augmenter la production et la purification des bactériocines, par exemple plusieurs auteurs ont rapporté que le Tween 80, interfère avec la purification de ces substances, en outre, il diminue l'activité antimicrobienne de *A. pediodicina* et lactocin S ayant acquis la production nécessaire de la souche d'intérêt, les cellules sont éliminées par centrifugation et la protéine est précipitée par addition de sulfate d'ammonium, suivie par plusieurs étapes de Chromatographie (CINTAS et al., 2001). D'autres méthodes ont été développées avec des séparations GC iA et selon le pH du milieu où ils ont réussi une version complète ou l'absorption de bactériocines dans la cellule. Une méthode de précipitation est utilisée plus commun avec du sulfate d'ammonium puis par HPLC chromatographie (TODOROV et al., 2004).

Pour vérifier les caractéristiques biochimiques des échantillons d'antibiotiques produits obtenus avec différentes protéases (aquimiotripsina, trypsine, protéinase K et pronase E), ou avec d'autres enzymes (α -amylase, la lipase A, lysozyme, aminopeptidase, mutanolysine, DNase traité, et ARNase) ; après que la taille du composé est déterminée non produit par ultrafiltration ou détecter une activité dans des gels dénaturants 15% de polyacrylamide (TIWARI et SRIVASTAVA, 2008). Champ d'action inhibitrice de la suite bactériocine par différents tests in vitro d'inhibition est déterminé.

(SETTANNI et al., 2008) décrivent deux techniques largement utilisées : l'antagonisme direct et indirect.

La première, consiste à faire croître la souche productrice substance inhibitrice d'un indicateur ou d'une souche sensible et observée après incubation, la formation de halos d'inhibition. Le second type d'antagonisme se développe en produisant des premières souches de la substance inhibitrice ainsi permettant de libérer la substance et alors seulement la souche contre laquelle il est souhaitable d'observer l'effet antagoniste est semée.

2.14 Exopolysaccharides de LAB

2.14.1 Définition de EPS

Les EPS sont des polysaccharides d'origine microbienne constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et/ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées (RUAS-MADIEDO et al., 2002).

Les EPS produits par les bactéries lactiques peuvent être attachés à la membrane bactérienne (EPS capsulaires) ou sécrétés directement dans le milieu (EPS libres) (MARSHALL et RAWSON, 1999).

Certaines bactéries peuvent produire à la fois des EPS libres et capsulaires (AYALA-HERNÁNDEZ et al., 2008).

Les EPS ont l'avantage d'être «naturels», requis en faible concentration (de l'ordre de mg/L) et de pouvoir remplacer les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation en bouche des laits fermentés (MARSHALL et RAWSON, 1999).

2.14.2 Caractéristiques et classification de EPS

Polysaccharides sécrétés par LAB peuvent être associés fermement à la surface de la cellule, et sont appelés capsulaire (CPS), ou bien peuvent être libérés dans la culture extracellulaire de donner la viscosité, et sont appelés exopolysaccharides simplement (EPS)(LI et al., 2012).

Selon leur composition chimique ils sont divisés en homopolysaccharides EPS (HOUBLON), et hétéropolysaccharide (HEPS) (BENNAMA et al., 2012).

Sur la base de sa structure, de houblon sont divisés en quatre groupes : (i) α -D-glucanes ; (ii) B-D-glucanes (iii) α -D-fructosane et (iv) polygalactanos. Ils possèdent

des poids moléculaires élevés (supérieur à 107 Da) et différents degrés de ramification, les types de connexion et longueur de la chaîne (MEULEN et al., 2007).

HEP sont composés de sous-unités répétées de la structure, ramifié ou non ramifié contenant de 3 à 8 monosaccharides. Ces HEPS sont généralement composés de D-galactose, le D-glucose, le L-rhamnose et dans des proportions différentes. Certains ont aussi fucose, ribose, sucre aminé acétylée (N-acétyl-glucosamine et la N-acétylgalactosamine), les acides uroniques et d'autres composés nature non glycosidiques tels que le phosphate, l'acétate et du glycérol (DEGEEST et al., 2001).

Il existe une grande diversité parmi les HEPS LAB qui varient dans la composition, la structure, la masse moléculaire, la production et la fonctionnalité (MEULEN et al., 2007).

En raison de sa composition et la masse moléculaire peut varier leurs HEPS de charge, organisation spatiale, la rigidité et la capacité d'interagir avec les protéines (DUBOC et MOLLET, 2001).

Toutes ces caractéristiques contribuent fortement aux caractéristiques spécifiques des EPS, telles que la solubilité, les propriétés rhéologiques et physicochimiques et fonctionnalité biologique (RUAS-MADIEDO et al., 2009).

Parmi les BAL d'une grande importance dans la capacité de synthétiser HEPS de l'industrie sont des souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei paracasei* *Lb rhamnosus* *Lb*, *Lb sakei*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lb acidophilus*, *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb delbrueckii subsp. lactis*, *Lb helveticus*, *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus* parmi d'autres (MOZZI et al., 2006).

2.14.3 Synthèse d'EPS

2.14.4 Rôle physiologique de la production d'EPS

Bien que le rôle physiologique de la production des EPS demeure inconnu, plusieurs hypothèses ont été émises. Les EPS contribueraient à protéger les bactéries contre les environnements hostiles et/ou toxiques, la séquestration de certains cations essentiels et la reconnaissance cellulaire (MERIBAI et al., 2016).

Les EPS pourraient également aider à la compétition contre les colonies envahissantes. Les EPS capsulaires possèderaient également une autre fonction; soit de protéger les bactéries lactiques contre l'attaque des bactériophages (BROADBENT et al., 2003).

L'effet protecteur des EPS produits par *Lactococcus lactis subsp. cremoris* a été étudié en présence de divers facteurs antimicrobiens tels les bactériophages, les tem-

pératures extrêmes (40, 50, 60 et 70 °C), la congélation (-40 °C), la lyophilisation, les antibiotiques (pénicilline et vancomycine), le lysozyme, la nisine (bactériocine), un métal toxique (cuivre) et le passage dans le tractus gastro-intestinal (LOOIJESTEIJN et al., 2001).

Une souche productrice d'EPS a été comparée à une souche non productrice. Afin de différencier l'effet bénéfique des EPS capsulaires par rapport aux EPS libérés dans l'environnement, le lactocoque non producteur d'EPS a été additionné d'EPS libres (contrôle).

Les EPS ont protégé les cellules bactériennes contre les bactériophages, le cuivre, la nisine et le lysozyme. Pour certains de ces facteurs, la présence de la couche superficielle formée par les EPS capsulaires a contribué à la protection de la bactérie lactique. Par contre, aucune protection n'a été observée contre les températures extrêmes et la congélation. La lyophilisation n'a pas influencé le développement bactérien. Les EPS n'ont pas affecté la survie microbienne pendant le passage dans un modèle simulant le tractus gastro-intestinal. Il est à noter que les EPS n'ont pas été dégradés pendant la digestion.

2.14.5 Biosynthèse d'EPS

La production d'EPS est régulée par plusieurs gènes au niveau chromosomique dans le cas des deux bactéries du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (CERNING et al., 1992).

La biosynthèse des EPS est effectuée par deux mécanismes distincts selon qu'elle soit extracellulaire ou intracellulaire (RUAS-MADIEDO et al., 2012). La production extracellulaire d'EPS tels que les dextrans et les levans, se réalise à l'extérieur de la cellule impliquant des enzymes lipoprotéiques soit dextran-sucrase et levan-sucrase, respectivement (DUBOC et MOLLET, 2001).

Le sucrose extracellulaire fournit les monosaccharides. Les sous-unités glucidiques non phosphoryées sont les premières à être formées. L'énergie requise, pour leur fabrication, provient de la catalyse du lien osidique du sucrose (DUBOC et MOLLET, 2001).

Par contre, les polysaccharides synthétisés à l'intérieur de la cellule (intracellulaire) sont fabriqués à partir des molécules d'uridine diphosphate (nucléotides) contenant des sucres simples. Ces composés biologiques fournissent à la cellule bactérienne un moyen de convertir les monosaccharides du nucléotide en d'autres sucres simples via des réactions d'épimérisation, de déshydrogénation et de décarboxylation. La syn-

thèse intracellulaire comporte quatre étapes (SUTHERLAND, 2001).

Le premier stade est l'activation des monosaccharides par la formation des nucléotides dans le cytoplasme. Par la suite, les unités répétitives sont assemblées. Les monosaccharides sont additionnés séquentiellement sur un transporteur lipidique. Le transfert est effectué par des enzymes spécifiques : les transférases. S'il y a un groupement acétyle, il est ajouté à ce stade. Ensuite, les macromolécules sont transférées, à l'aide du transport lipidique, vers la membrane extérieure de la cellule. Finalement, les sous-unités répétitives seront rattachées formant ainsi le squelette du polysaccharide.

2.14.6 Structure moléculaire d'EPS

Les EPS produits par les bactéries lactiques sont divisés en deux groupes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (SALAZAR et al., 2009). Pour le premier groupe, l'EPS est constitué d'un seul type de mono-saccharides tandis que les EPS du second contiennent une séquence répétée de deux ou plusieurs sucres simples. Les homopolysaccharides sont composés soit de glucose (α -D-glucans ou -D-glucans), soit de fructose (fructans) ou soit de polygalactane sous forme pyranose ou furanose (MEULEN et al., 2007).

Chapitre 3

Matériels et Méthodes

3.1 Objectifs

L'objectif principal de ce travail est premièrement d'identifier phénotypiquement et génotypiquement les souches lactiques isolées à partir des différents laits fermentés (Brebis, Chèvre, Chamelle, Vache) par les étapes suivantes :

⇒ Isolement des bactéries lactiques thermophile à l'aide des milieux et condition idéale .

⇒ Identification phénotypique en utilisant les caractéristiques physiologiques et biochimiques.

⇒ Confirmation du type de souches isolées par identification génotypiques en utilisant la méthodes de rep-PCR (GTG)₅ et 16S rDNA séquençage.

Deuxièmement, étudier les aptitudes technologiques en étudiant :

⇒ L'activité acidifiante.

⇒ L'activité protéolytique .

⇒ L'activité antagonisme.

⇒ La sensibilité aux antibiotiques

⇒ La production d'exopolysaccharides.

et aussi les aptitudes probiotiques en focalisant sur :

⇒ La tolérance au stress acide à pH 2.

⇒ La tolérance aux sels biliaires à 0.3 %.

⇒ La tolérance au pepsine à 3mg.

⇒ La tolérance au stress thermique à 65°C.

⇒ L'activité hémolytique.

3.2 Prélèvement des échantillons

Au total 20 échantillons ont été prélevés à l'aide de traite manuel dans la période d'octobre à novembre 2015, cela a été fait à partir des différents laits : brebis, chèvre, vache, chamelle. collectés dans de deux fermes :

⇒ 15 échantillons de la première ferme à Relizane (Sidi M'hamed Benali) .

⇒ 5 échantillons de la deuxième ferme à Adrar (Bouda).

Cette diversité d'échantillons a pour but d'obtenir une collection de souches appartenant à des espèces lactiques différentes.

Les échantillons ont été transportés dans des boîtes isothermes de 4°C acheminés au laboratoire pour être analysées à l'arrivée.

Le tableau (3.1) représente les codes des échantillons avec les sources et le lieu des prélèvements.

3.2.1 Le lieu de travail

Les travaux ont été effectués dans trois laboratoires.

⇒ Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielles, Université de Ahmed Ben Bella Oran 1 .

⇒ Laboratoire de bioconversion de l'unité des énergies Renouvelables en milieu saharien, Adrar.

⇒ Laboratoire de Microbiologie alimentaire de l'université de Copenhague Danemark .

TABLE 3.1: Les sites d'échantillonnage et les codes des échantillons .

Code	échantillons	Nombre d'échantillons prélevés	le site
ED	Dromadaire	5	Adrar
EB	Brebis	5	Relizane
ECH	Chèvre	5	Relizane
EV	Vache	5	Relizane

3.2.2 Préparation des échantillons

Après une homogénéisation vigoureuse, on a réalisé une série de dilution décimale de (10^{-1}) à (10^{-8}) à l'aide de l'eau physiologique composée 1% de peptone et

de (8.5%) Nacl (ASHRAF et SHAH, 2011).

À partir des trois dernières dilutions on a déposé 0.1 ml dans trois boîtes de pétri contenant le milieu MRS acidifié par acide acétique de pH 5.4 et autres trois boîtes de pétri contentes le milieu M17 additionnée 5 % de lactose de pH 6,8. On a étalé par la suite les gouttes sur les milieux des cultures avec une pipette pasteur stérile. Les boîtes sont incubées à 42°C pendant de 24 h à 72 h au milieu anaérobie comme indique la figure (3.1) (MEDOUAKH et al., 2010).

3.2.3 Isolement et purification des souches bactériennes

Les colonies bactériennes bien isolées de morphologie différentes sont repiquées dans les milieux MRS et M17 bouillons .Après cela on a effectué une coloration de Gram et un test de catalase, les bactéries à Gram (+) et catalase(-) sont retenues. La purification des colonies est effectuée sur le milieu solide par la méthode des stries.

Ces étapes sont répétées plusieurs fois jusqu'à l'obtention des colonies de forme typique (c'est-à-dire des colonies homogènes) et elles sont retenues pour la suite d'étude (BELARBI et BENSOLTANE, 2011).

3.2.4 Les conditions de culture et de conservation

3.2.5 Les milieux de culture

Des milieux de culture sélectifs ont été utilisés pour l'isolement des bactéries :

- ⇒ **LM17** ce milieu au quel est additionné 5% de lactose est recommandé pour la culture de *Streptococcus* et d' *Entérocooccus* (TERZAGHI et SANDINE, 1975).
- ⇒ **MRS** ce milieu est acidifié par acide acétique de pH 5.4 , est recommandé pour la culture de *Lactobacilus* (DE MAN et al., 1960).

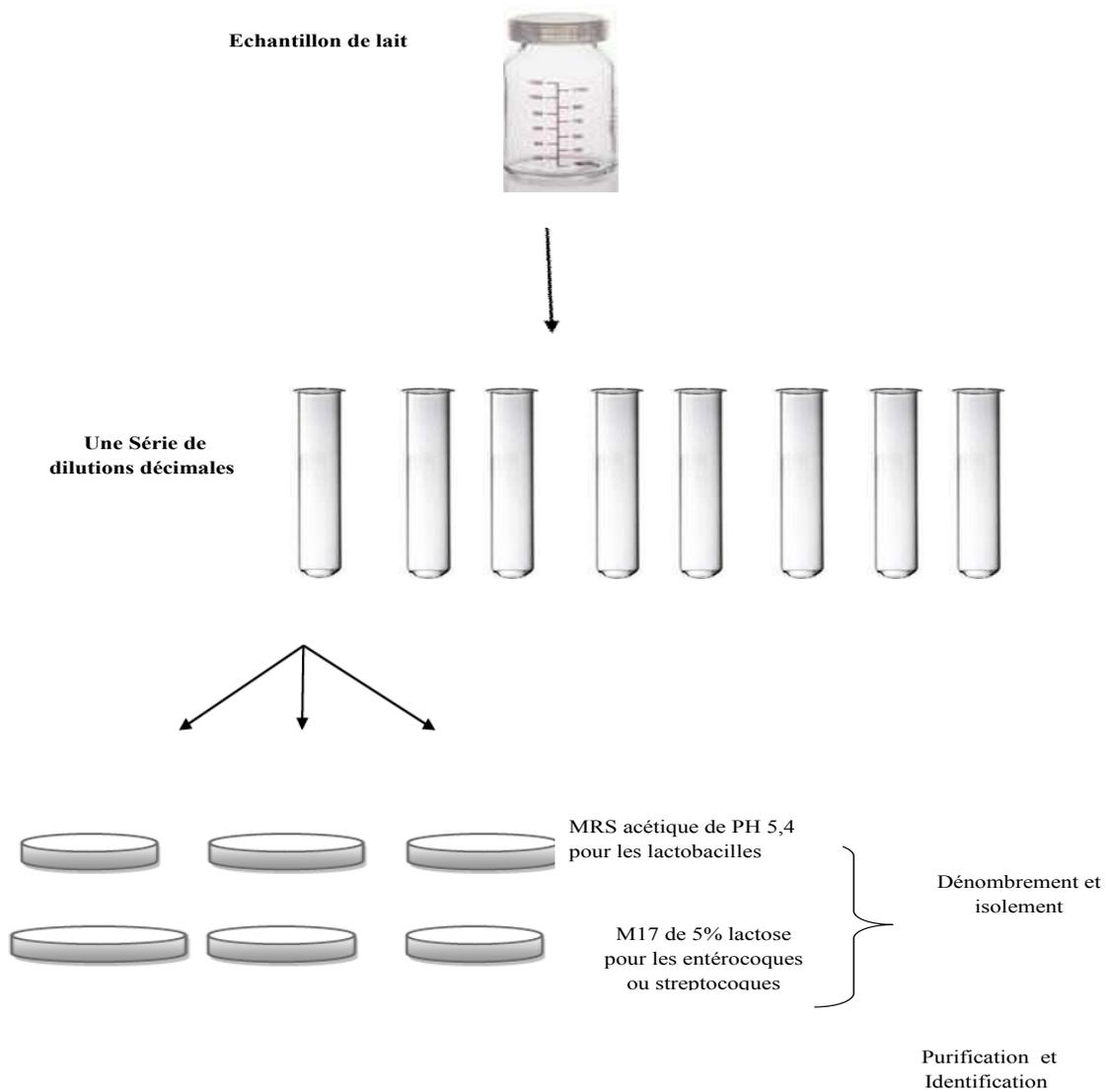


FIGURE 3.1: Protocole d'isolement des bactéries lactiques .

3.2.6 Condition de conservation

On a réalisé deux types de conservation :

⇒ **La Conservation de courte durée** : a été effectuée à 4°C, dans une gélose MRS ou M17 inclinée et suivie par un repiquage toutes les 4 semaines.

⇒ **La conservation de longue durée** : a été réalisée par centrifugation d'une culture jeune à 4000 tours par minute pendant 10 min. Le culot obtenu est gardé à -20° C dans lait écrémé enrichi à (0.05% de l'extrait de levure) et 30% de glycérol.

3.2.7 Caractérisation phénotypique des isolats

3.2.7.1 Étude macroscopique

Cette étude permet de distinguer les caractéristiques d'une colonie obtenue sur les milieux solides tels que la taille, la couleur, la forme, l'aspect et l'odeur à l'œil nu et à la loupe microscopique.

3.2.7.2 Étude microscopique

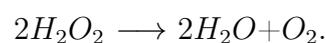
L'étude microscopique permet par l'intermédiaire de la coloration de gram et la coloration simple d'examiner la forme, le mode d'association de ces bactéries : (amas, chaînette, tétrade) .

3.2.7.3 Étude physiologique et biochimique des isolats

Les souches isolées ont subi d'autres tests d'identification à savoir :

3.2.7.4 Test catalase

Ce test consiste à déposer sur une lame, une colonie bactérienne prélevée avec une goutte de l'eau oxygénée (10 volumes) dans laquelle la catalase permet de décomposer l'eau oxygénée à l'eau et oxygène par la réaction suivante : :



La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de catalase (les bactéries lactiques sont catalase

négative)(GUETARNI et BENSOLTANE, 2013).

3.2.7.5 Test de type fermentaire

Ce test permet déterminer le type fermentaire (hétéro/homo), il consiste à mettre en évidence de la production éventuelle du gaz (CO₂). Le test est effectué en inoculant le germe à tester en milieu MRS et M17 contenant une cloche de Durham puis incubé à 42°C pendant 24 à 48 heures (CHOUGRANI et al., 2009).

3.2.7.6 Test de croissance à 10°C et à 45°C

Ce test consiste à mettre en évidence les souches thermophiles et les souches mésophiles. Il est réalisé en bouillon MRS et M17. La croissance bactérienne se manifeste par un trouble dans les tubes à essai en comparant avec témoin négatif (non ensemencé) après l'incubation de 24 à 72 heures (MERIBAI et al., 2016).

3.2.7.7 Test de croissance aux milieux hostile

3.2.7.8 Bouillon hyper salé (2.5 % ; 4 % ; 6.5%)

La méthode consiste à ensemencer les isolats dans des tubes de milieu MRS et M17 à différentes concentrations à savoir 6.5% , 4%, 2. 5% pour sélectionner les bactéries qui sont capables de se croître dans ces milieux et surtout de différencier entre les Streptocoques et les Entérocoques (CHERIGUENE et al., 2007).

3.2.7.9 Test de lait de sherman

Dans ce technique avons testé l'aptitude des souches forme cocci à croissance au lait écrémé additionnée le bleu de méthylène à concentrations de 0. 1%. Certains coques sont capables de se développer dans ce milieu à 42°C pendant 48 heures . La réaction positive se traduit par le virage de bleu de méthylène vers le transparent (MAGHNIA et BENSOLTANE, 2011).

3.2.7.10 Test de croissance à milieu hyperalcalin

Ce test est réalisé uniquement pour les coques sur milieu M 17 ajusté à pH 9.6. quelque colonies de culture jeune de type cocci ont été repiquées dans un milieu M17 de pH 9.6 et incubé à 42°C .

Le résultat positif est apprécié par les troubles qui signifient la bactérie pousse au milieu hyperalcalin (pH 9.6).

3.2.7.11 Test de thermorésistance

Ce test permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches sélectionnées sont inoculées dans des tubes contenant le bouillon M 17 et mises dans un bain-marie à 63,5°C pendant 30 minutes. L'observation de trouble démontre la croissance bactérienne (HOLZAPFEL et al., 1995).

3.2.7.12 Test d'esculine

Ce test est important car, il permet de distinguer entre les *Entérocooccus sp* et les *Streptocoques thermophilus* qui sont dépourvues de cette activité enzymatique. Le principe de ce test est la recherche de l'enzyme esculine hydrolase qui dégrade l'esculine en glucose et esculetine. Ce dernier vire la couleur du milieu du jaune vers le noir en présence du citrate ferrique due à la formation d'esculine ferrique (BEN-NAMA et al., 2012).

3.2.7.13 Test de fermentations des sucres

L'étude du profil fermentaire est basée sur l'utilisation du bouillon MRS modifié (sans extrait de viande et sans glucose) additionnée 0.0.25% de pourpre de bromocérol comme indicateur du pH et du sucre à tester avec une contraction finale de 1% à savoir glucose, Maltose, fructose, raffinose, xylose etc..

Pour réaliser ce profil, les souches testées sont inoculées dans des tubes M 17 et incubées à 42°C pendant 18 h. La culture de chaque souche est centrifugée à 5000 trs pendant 15 minutes.

Le culot est récupéré et lavé deux fois en utilisant la peptone saline puis recentrifugé pour se débarrasser des restes du milieu et obtenir un culot cellulaire pur, 5 ml du milieu MRS a été ensemencé par le culot cellulaire en ajoutant le 100 μ l des sucres précédemment cités.

Après l'ensemencement le mélange est recouvert par quelques gouttes de l'huile de paraffine pour assurer le milieu anaérobie. Après 48 heures d'incubation, la fermentation du sucre se traduit par le virage de la couleur du pourpre au jaune (LOUMANI et BENSOLTANE, 2016).

3.2.8 Identification bactérienne en utilisant les Galerie API

Ce test permet de continuer l'identification des isolats au niveau de l'espèce et sous- espèce en utilisant leur profile fermentaire à l'aide de système API 20 strep et API 50CHL (CHERIGUENE et al., 2007).

3.2.8.1 API20 strep

Ce système se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence des enzymes ou la fermentation des sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions est faite à l'aide du tableau de lecture et l'identification, du catalogue analytique ou logiciel pibwin,figure(3.4)

3.2.8.2 Préparation de l'inoculum

Les colonies bactériennes présomptives des *Entérocoques* et des *Streptocoques thermophilus* ont été inoculées dans une ampoule de 2 ml de milieu en suspension de API 20 Strep avec une opacité supérieure à 4 sur l'échelle de MC Farland .

Après l'homogénéisation , la suspension a été répartie dans les microtubes qui contiennent les substrats déshydratés, puis on les a recouverts par l'huile de paraffine stérile afin d'assurer les conditions d'anaérobies.

La galerie a été incubée à 42°C pendant 4 heures pour la première lecture et 48 heures pour la deuxième lecture . Après 4 heures d'incubation les réactifs VP1 (1 goutte), VP2 1(goutte) ont été ajoutés au test VP, et ZYMA (1 goutte) et ZYMB (1 goutte) pour les tests PYRA, α Gal, β GUR, β Gal, PAL et LAP.

3.2.8.3 API50 CHL

L'API 50 CHL est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes.

Ce système permettant d'identifier API 50 CH est utilisé en combinaison avec le milieu de API 50 CHL pour l'identification de *Lactobacilles*.

La galerie API 50 est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyacools, acides uroniques).

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. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif, figure (3.3)

3.2.8.4 Préparation de l'inoculum

La culture bactérienne présomptive des *Lactobacilles* est cultivée sur le milieu MRS avec une température optimale 42°C. Après 24 h d'incubation quelques colonies denses sont récupérées, centrifugées deux fois à 5000 trs/mn pendant 15 minutes. Le culot est re-suspendu dans 5 ml d'eau distillée pour obtenir une opacité de 2 MC Farland, ensuite on transfère à l'aide d'une pipette pasteur quelques gouttes de la suspension initiale (2ml) vers l'ampoule de 10 ml milieu API 50 CHL, comme indique la figure (3.2).

Après la préparation des boîtes, la galerie est inoculée en répartissant la suspension bactérienne supplémentée à l'aide de pipette pasteur et recouverte avec l'huile de paraffine (BioMérieux France).

La lecture des réactions est réalisée après 24 et 48 h en se référant au tableau de lecture. L'identification des souches est effectuée grâce au tableau analytique ou le logiciel pibwin. (CHERIGUENE et al., 2007).

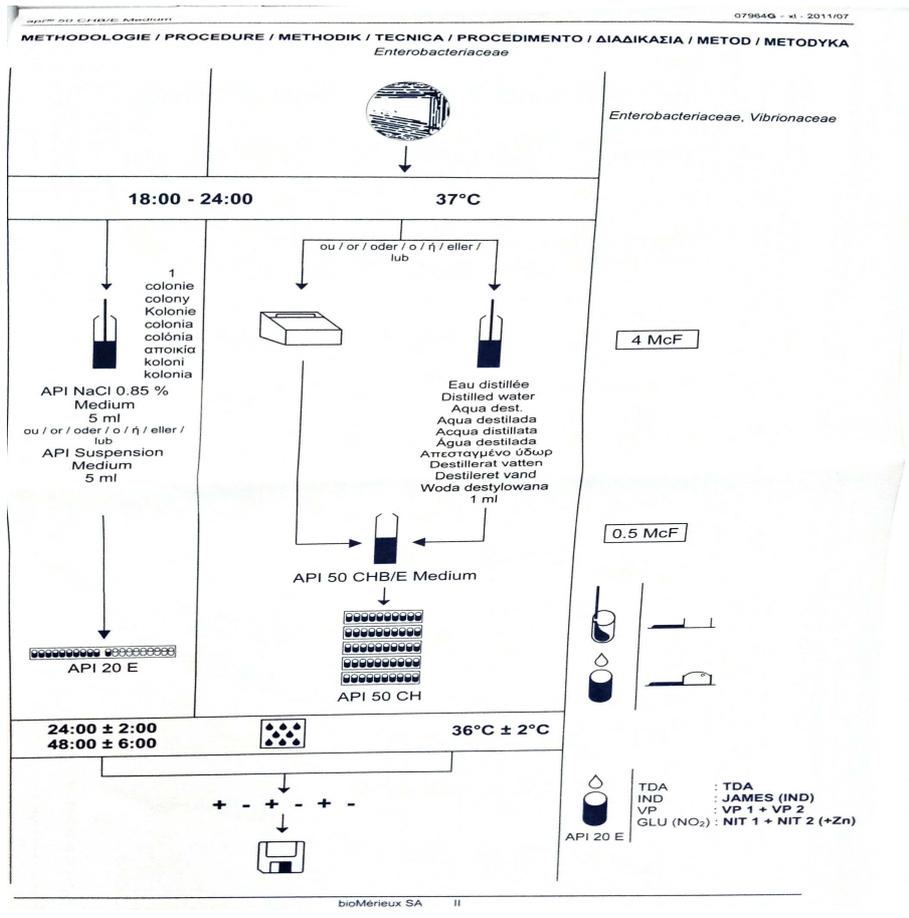


FIGURE 3.2: Diagramme illustrant les étapes suivies pour préparer l'inoculum.



FIGURE 3.3: La galerie API 50 CHL avant l'ensemencement .

0 : Témoin, **GLY** : Glycérol, **ERY** : Erythritol, **DARA** : D-Arabinose, **LARA** : L-Arabinose, **RIB** : D- Ribose, **DXYL** : D- Xylose, **LXYL** : L-Xylose, **ADO** : D-Adonitol, **MDX** : Méthyl- β D-Xylopyranoside, **GAL** : D-Galactose, **GLU** : D-Glucose, **FRU** : D-Fructose, **MNE** : D-Mannose, **SBE** : L-Sorbose, **RHA** : L-Rhamnose, **DUL** : Dulcitol, **INO** : Inositol, **MAN** : D-Mannitol, **SOR** : D-Sorbitol, **MDM** : Méthyl- α D- Mannopyranoside, **MDG** : Méthyl- α D-Glucopyranoside, **NAG** : N-AcétyleGlucosamine, **AMY** : Amygdaline, **ARB** : Arbutine, **ESC** : Esculine, **SAL** : Salicine, **CEL** : D-Cellulose, **MAL** : D-Maltose, **LAC** : D-Lactose, **MEL** : D-Mélibiose, **SAC** : D-Saccharose, **TRE** : D-Trehalose, **INU** : Inuline, **MLZ** : D-Mélicitose, **RAF** : D-Raffinose, **AMD** : Amidon, **GLYG** : Glycogène, **XLT** : Xylitol, **GEN** : Gentiobiose, **TUR** : D-Turanose, **LYX** : D-Lyxose, **TAG** : D-Tagatose, **DFUC** : D-Fucose, **LFUC** : L- Fucose, **DARL** : D-Arabitol, **LARL** : L-Arabitol, **GNT** : Gluconate, **2KG** : 2-CétoGluconate, **5KG** : 5-CétoGluconate

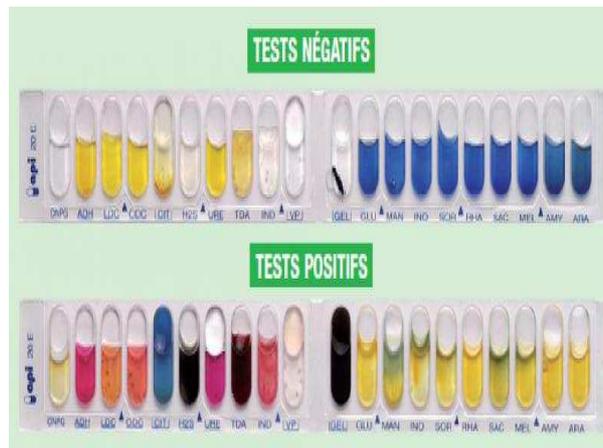


FIGURE 3.4: La galerie API 20 Strep avant l'ensemencement .

VP : Sodium pyruvate, **HIP** :acide hippique, **ESC** :esculine de fer ,**PYRA** :acide pyroglutamique β :naphtylamide, α **GAL** : 6-bromo-2-naphtyl- β Dgalactopyranoside, **8GUR** : acide naphtol-ASBIglucuronique, **8GAL** : 2-naphtyl-8Dgalactopyranoside, **PAL** : 2-naphtyl phosphate, **LAP** : L-leucine-8-naphtylamide, **ADH** : L-arginine, **RIB** : D-ribose, **ARA** : L-arabinose, **MAN** : D-mannitol, **SOR** : D-sorbitol, **LAC** : D-lactose , **TRE** : D-tréhalose, **INU** : inuline, **RAF** : D-raffinose, **AMD** : amidon (2), **GLYG** : glycogène

3.3 Identification génotypiques des isolats

La caractérisation moléculaire est indispensable pour confirmer la caractérisation des souches isolées déterminées précocement , Il s'agit de réaliser la réaction de la chaine polymérase (PCR) en utilisant la technique rep -PCR avec l'amorce (GTG)₅ du gène codant de 16S RNA selon la méthode décrite par (NIELSEN et al., 2007).

3.3.1 Extraction d'ADN Total par l' instagene BioRad

Selon le protocole décrit par (ADIMPONG et al., 2012) , à partir des souches cultivées dans les milieu MRS et M17 ,une colonie est repiquée dans 10ml de MRS et M17 et incubée pour obtenir une phase exceptionnelle.Cette culture est centrifugée (3000 trs/mn à 10 minutes). Le surnagent est écartée et le culot est ré-suspendu dans 1ml de tampon lyse de InstaGene matrix (50 mM tris Hcl,Ph 5,5,1 % SDS, Proteine Kinase lysine buffler et billes de vers) et transfère dans un tubes à Eppendorff . La préparation est ainsi incubée à 56°C pendant de 10 à 30 minutes,ensuite, la lyse cellulaire obtenue est soumise a une agitation au vortex à grande vitesse et chauffée à 100 et centrifugée une seconde fois (3000trs/min) pendant 8 minutes. Enfin,le surnagent est recueilli dans des éppendorffs stériles est conservé à +4° C jusqu'à l'utilisation ,figure (3.5).

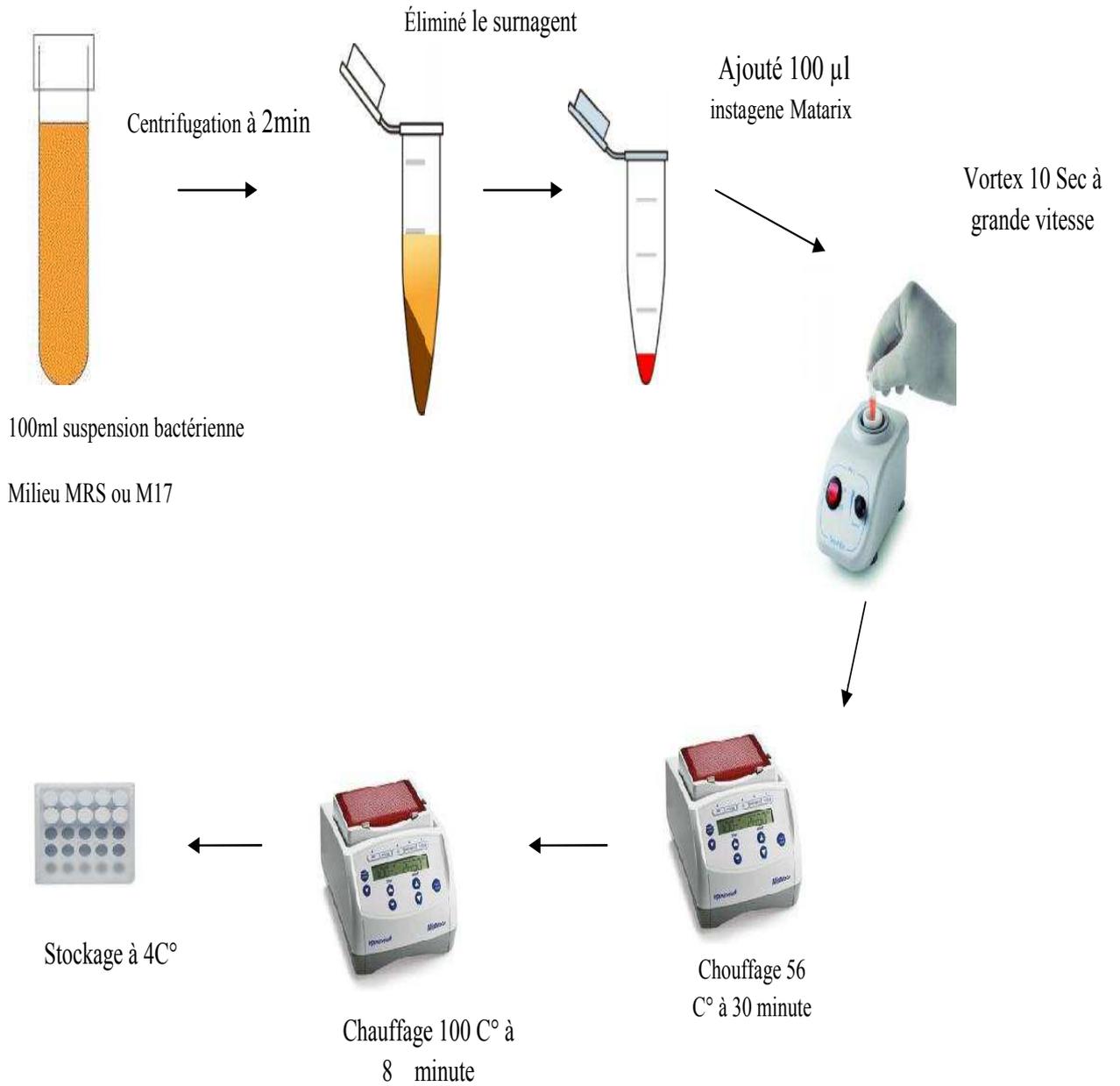


FIGURE 3.5: Extraction d'ADN bacterien selon (ADIMPONG et al., 2012).

3.3.1.1 Amplification d'ADN par méthode de rep-PCR (GTG)5 :

C'est une technique de biologie moléculaire permettant le génotypage d'isolats microbiens ,elle est très appropriée pour identification rapide et provisoire. Elle est basée sur l'amplification par PCR de plusieurs séquences répétitives et non codantes du génome.

L'amorce oligonucléotidique universelle GTG5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3')(DNA Technology A/S, Denmark) a été utilisé pour amplifier les gènes codants à l'ARNr 16S, tableau (3.2).

La technique consiste à introduire $3\mu\text{l}$ d'ADN bactérien dans un volume réactionnel avec un volume final de $25\mu\text{l}$ contenant $13\mu\text{l}$ PCR teq polymerase Mastermix , $5\mu\text{l}$ amorce (GTG5, $5\mu\text{M}$) , $4\mu\text{l}$ l'eau distillée stérile.

La réaction s'effectue dans thermocycleur(GeneAmp PCR System 9700), ce programme est réalisé dans différentes étapes à savoir la dénaturation initiale qui se caractérise par le chauffage à 95°C pendant 5 minutes, . Ensuite, le mélange est passé par 35 cycles d'amplification qui composent trois phase : la première est la dénaturation à 95°C d'une période 30 secondes suivie par la phase d'hybridation qui dure généralement 60 secondes à une température de 45°C , la dernière phase représenté l' élongation qui se fait à la température de 65°C pendant 8 minutes. Le programme s'achève par un cycle supplémentaire dite, élongation finale à température de 65°C et dure 16 minutes pour assurer la polymérisation total des molécules d'ADN en cours de synthèse .À la fin du programme, l' ADN synthétisé obtenu est conservé à 4°C pour la suite d'études (ADIMPONG et al., 2012).

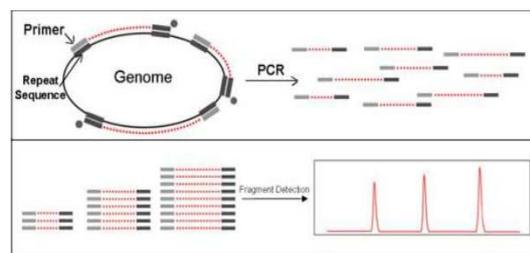


FIGURE 3.6: Le principe de fonctionnement de la rep- PCR.

3.3.1.2 Electrophorèse sur le gel Agarose 1,5%

Cette étape consiste à déterminer la taille du fragment d'ADN amplifié précédemment en utilisant le marqueur de taille de 1500bp sur un gel d'agarose de 0.5 % dans une solution de TBE qui comporte (108g/l de Trisbase ,1,55g/l de acide borique et 40 ml de 0,5 M EDTA, PH 8,0) .

La migration se fait sous un voltage de 120 volts pendant 5 heures dans les cuves électrophorèses horizontales(bio red).

À la fin de l'opération, le gel est immergé dans la solution bromure d'éthidium de durée de 15 Min et dans une cuve d'eau,le gel est observé sous une concentration transilluminateur à UV (alpha innotech).Enfin,les profils électrophorétiques obtenus sont traités et normalisés à l'aide de logiciel software Bionumerics (Applied Maths, Ghent) afin de claustrer les souches en groupe selon la similarité coefficient de Dice,figure (3.7).

3.3.1.3 Amplification et séquençage de 16S rRNA gène

L'amplification du gène 16s RNA des souches sélectionnées ,qui représente de chaque groupe similaire a été effectuée en utilisant deux amorces à savoir : 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') qui est hybride au début de 16S rDNA gène et 16S-1540R(5'-TACGGTGGYTACCTTGTTACGAT-3') qui hybride a la fin de 16S rDNA dans un volume réactionnel de 50 μ l qui comporte : 26 μ l de PCR Mastermix (2,5 μ l de 10X Tampon ,2 μ l dNTP'S, 1,25 U Taq polymeras ,2 mM Mg Cl₂), 5 μ l de amorce , 16 μ L l'eau distillée stérile et 3 μ l ADN bactérien .

Ce mélange est soumis au programme PCR thermocycleur dans six étapes a savoir : une étape de chauffage à 95° C pendant 5 min , ensuite à 95°C pendant 30 secondes , et après passage par 35 cycles d'amplification 60°C à 30 secondes , 72°C à 120 secondes, 72°C et enfin 72°C à 10 min (ALTSCHUL et al., 1997).

TABLE 3.2: Les amorces universelles utilisées.

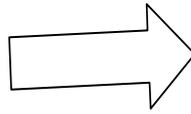
nome	séquences (5' à 3')	la taille (bp)	référence
GTG5	(5'-GTG GTG GTG GTG 3')	1500	DNA Technology A/S,Denmark
27f	(5'- AGAGTTTGATCMTC-3')	1500	DNA Technology A/S,Denmark
1540r	(5'- AGAGTTTGATCMTC-3')	1500	DNA Technology A/S,Denmark
785F	(5'- AGAGTTTGATCMTC-3')	1500	Macrogen Inc., Korea.
907R	(5'- CCGTCAATTCMTT-3')	1500	Macrogen Inc., Korea.

3.3.1.4 Traitement des séquencés de l'ADN amplifié

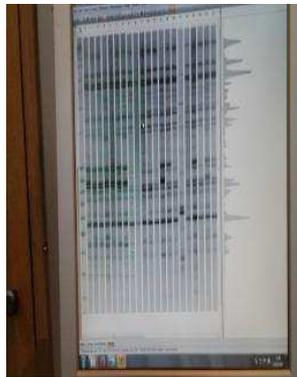
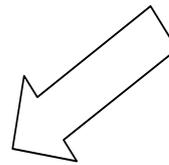
Les échantillons de l'ADN amplifié sont soumis à trois traitements à savoir :
 Les échantillons d'amplifications ont été séquencés par des amorces universelles au service de Macrogene système automatique (ABI PRISM 373) la figure.(3.2),ensuite Les séquences nucléotidique obtenues sont analysées et corrigées à l'aide de programme de Chromas version 1.45(Applied Maths, Kortrijk) .
 Enfin ,Les séquences traitées sont alignées en utilisant le service NCBI blaste sur le site [http : \(//www.ncbi.nlm.nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov),figure (3.8).



La migration sur Electrophorèse



L'observation sous UV Alpha innotech



Traitement le gel avec Logiciel software Bionumerics

FIGURE 3.7: Les étapes d'obtention du gel d'Agarose .

The image shows the NCBI BLAST website interface. At the top, there are logos for NIH (U.S. National Library of Medicine) and NCBI (National Center for Biotechnology Information), along with a 'Sign in to NCBI' link. The main header features the 'BLAST' logo and navigation links for 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'.

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

NEWS

IgBLAST 1.8.0 released
A new version of IgBLAST is now available.
Wed, 15 Nov 2017 16:00:00 EST

[More BLAST news...](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide → nucleotide

blastx
translated nucleotide → protein

tblastn
protein → translated nucleotide

Protein BLAST
protein → protein

BLAST Genomes

FIGURE 3.8: Interface de site service blaste NCBI pour la soumission des séquences on line sur le site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

3.4 Phylogénie moléculaire du gène 16S rDNA des souches isolées

L'analyse phylogénique moléculaire est basée sur l'application du logiciel software (MEGA7) .Ce dernier nous permet de réaliser l'alignement des séquences 16S rDNA de chaque souche obtenue lors de cette étude et de dresser l'arbre phylogénique en utilisant la méthode Neighbor-Joining.

La figure (3.9) représente l'interface de logiciel MEGA7 afin de soumission les séquences des souches obtenues.

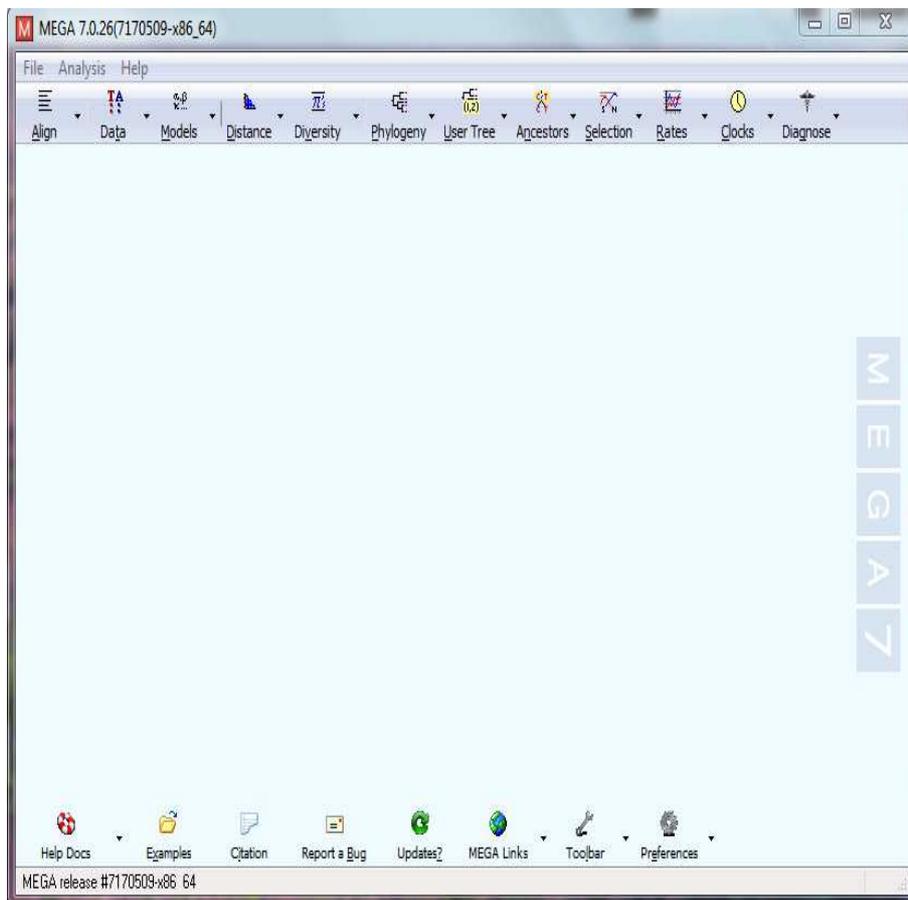


FIGURE 3.9: Interface de construction l'alignement les séquences du gènes 16S rRNA des souches bacilles obtenues réalisée par logiciel MEGA7 .

3.5 Les aptitudes technologiques des isolats

3.5.1 Le pouvoir acidifiant

Les bactéries lactiques se caractérisent par la production de l'acide lactique qui est considéré parmi les aptitudes technologiques les plus importantes. La cinétique de l'acidité permet de sélectionner des souches indigènes selon leur performance afin d'utiliser comme des starters dans l'industrie.

Le principe de cette méthode consiste à déterminer le dosage de l'acide lactique par la titration en utilisant le NAOH (N/9) en présence de l'indicateur coloré (phénol-phtaléine). Le lait écrémé stérile est inoculé par une culture bactérienne de 18h et incubé à 42°C, les mesures de l'acidité sont effectuées à l'intervalle de temps suivant (0.2.4.6.24.48.72) heures. L'échantillon de lait fermenté est versée dans un bécher en ajoutant quelque goutte de phénol-phtaléine à 1%.

Le titrage de l'acidité est effectué à l'aide de burette, lorsque la couleur de lait fermenté vire au rose pâle, le volume de soude qui apparaît sur la burette graduée est noté.

Les résultats obtenus sont exprimés en degrés Dornic (D°) selon la formule suivante :

$$D^{\circ} = V_{NAOH} \times 10.$$

V=NaOH : le volume de NAOH écoulé pour titrer 10 ml de lait fermenté

D ° = 0.1g de l'acide lactique

3.5.2 L'activité protéolytique

Pour évaluer l'activité protéolytique, la gélose au lait a été préparée en ajoutant 1% de lait en poudre dans le milieu PCA, selon la méthode décrite par (BEERENS et al., 1990).

La surface séchée du milieu gélose au lait a étéensemencé par une culture jeune de la souche testée. Les boîtes sont incubées à 42°C pendant 48h .Les colonies forment un halo claire qui est considéré comme un résultat positif.

3.5.3 L'activité antagonisme

L'activité d'antagonisme des isolats vis -à- vis des souches pathogènes a été réalisée en utilisant la méthode indirecte par la diffusion agar (well diffusion assays) selon Schlillnger and Luck (1989). Les bactéries pathogènes indicatrices utilisées sont *E. coli* (ATCC 25955), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7659) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) qui ont été cultivées dans le bouillon nutritif (BN).

Dans cette méthode , quelques colonies ont été sélectionnées de chaque souche pathogène et suspendu dans 4 ml l'eau distillée stérile pour obtenir de concentration de $10^8 ufc/ml$,l' équivalent d'opacité de 5 MC Farland , ensuite un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension et inoculée dans des boîtes de MHA (Muller Hinton agar), jusqu'à absorption, ensuite,le surnageant de nos souches a été obtenu après la centrifugation à (300trs/mm) de 20 ml de bouillon MRS ou M17 cultivé et ensemencé en touche sur les boites de MHA(Muller Hinton) . La susceptibilité des pathogènes aux disques a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques (diamètre - mm) après incubation pendant 24 h à 37°C. Une zone claire d'inhibition de diamètre au moins 2 mm a été enregistrée comme positif. L'expérience a été réalisée en triple(ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015), figure (3.10).

3.5.4 Production EPS

La production d'exopolysaccharide (EPS) à partir d'isolats LAB a été testée selon la méthode décrite par (YAVUZDURMAZ et HATICE, 2007), avec des modifications.

Les cultures LAB ont été cultivées dans des flacons coniques contenant 20 ml de bouillon MRS additionné de glucose à 2 % (p/v) à 37 °C pendant 3 jours.

Les cellules bactériennes ont été éliminées par une centrifugation à 6000 *tr* pendant 20 minutes, deux volumes d'éthanol froid à 95% (v/v) ont été ajoutés à un volume de surnageant de culture pour la précipitation EPS. Les précipités ont été récupérés par filtration sous vide et séchés à 60 °C. Leur poids a été mesuré pour déterminer la quantité d'EPS produite.

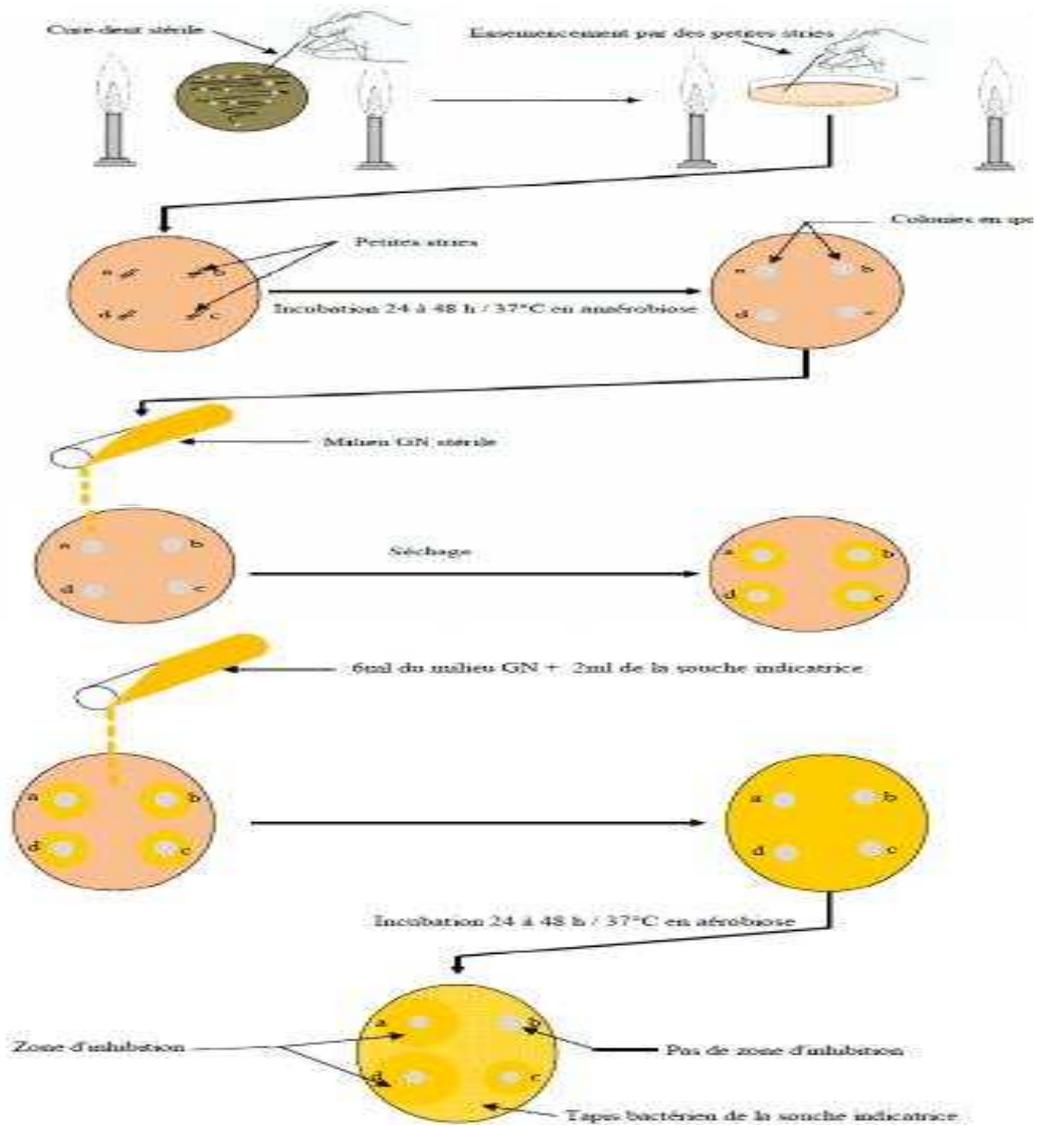


FIGURE 3.10: Diagramme montrant les étapes suivies pour l'évolution du pouvoir antimicrobien des bactérie lactiques (MAGHNIA et BENSOLTANE, 2011)

3.5.5 Production de diacétyle

Après la croissance, les isolats ont été centrifugés à 4 000 tr / min . Le culot a été remis en suspension dans de l'eau de peptone et inoculé 1% (p / v) dans 10 mL de lait UHT entier et incubé à 30 ° C pour 24 h. Ensuite, on a ajouté 1 ml de culture à 0,5 ml de α -naphthol solution 1% (p / v) et KOH 16% (p / v) suivis d'une incubation à 37°C pendant 10 min. La production de diacétyle a été indiquée par la formation d'une bague rouge dans les tubes (King, 1948). Les résultats ont été classés comme faible, moyen ou fort selon l'intensité de la couleur de l'anneau formé.

3.5.6 Thermosistance

Des aliquotes de 0,5 ml d'inoculum ont été transférées dans des flacons en verre avec 49,5 ml d'eau de peptone tamponnée (BPW, LabM) à pH 7,0. Les flacons ont été conservés à 65°C et des échantillons ont été prélevés au moment 0 (temps d'inoculation), (10, 20, 30, 40, 50 et 60) min. Tous les essais ont été effectués en trois essais .

3.6 Evaluation des propriétés probiotiques

Les bactéries lactiques (LAB) se caractérisent par l'innocuité considérée qui sont considèrent l'un des critères des plus importants en raison de sa capacité de survie ou viabilité durant et à travers le tube digestif. Les souches probiotiques doivent franchir les obstacles du tractus digestif tel que l'acidité du pH, les enzymes pancréatiques, les sels biliaires jusqu'à l'arrivée au site d'action(SALVUCCI et al., 2016).

3.6.1 Simulation de la tolérance au tractus gastro-intestinale

Afin de simuler la survie dans le tractus gastro- intestinale , des souches lactiques sélectionnées ont été testées dans le model in vitro en utilisant des produits chimiques pour examiner leurs physiologies cellulaires.

Les souches sélectionnées issues d'une culture jeune de 10^8 *ufc/ml* approximativement ont été centrifugées (3000trs/mn) pendant 10 minute ,ensuite le culot a été récupéré et rincé trois fois par la solution PBS stérile qui comporte les ingrédients suivants (K₂ HPO₄ :1.41g, KH₂ PO₄ :0.26g NaCl8g) de pH7.

3.6.1.1 Tolérance à l'acidité

L'acidité de l'estomac varie de pH 1,5 à 6 qui est la première barrière biologique. Certains microorganismes peuvent résister cette condition gastrique en raison des facteurs favorables telles que l'adaptation à l'acidité. Pour le test de tolérance de l'acidité, le culot de chaque souche a été inoculé dans le milieu PBS stérile ajusté à pH 2.0. Le nombre de cellules viables a été déterminé après exposition aux conditions acide pendant (0, 60, 120, 180)Min à 37°C. L'expérience a été réalisée en trois fois.

3.6.1.2 Résistance à la pepsine

La deuxième barrière biologique contre les bactéries est représentée par la pepsine qui est une enzyme sécrétée par l'estomac et considérée comme un défi pour nos souches testées. Pour le test de tolérance de la sécrétion de l'estomac, le culot inoculé de milieu PBS de pH 2 additionné 3 mg /ml de pepsine (sigma) (NAMI et al., 2014b).

3.6.1.3 Tolérance aux sels biliaires

Au niveau de la flore intestinale, une autre barrière biologique est représentée par les sels biliaires sécrétés par le foie, qui ont un effet d'inhibition vis-à-vis de la prolifération bactérienne.

pour ce test, le culot obtenu précédemment est inoculé dans le milieu PBS additionné 0.3% de sels biliaires bovine.

Le taux de viabilité a été déterminé par le dénombrement des cellules viables durant de 3 heures d'incubation.

3.6.2 Sensibilité aux antimicrobiens

Dans le test de la sensibilité aux antimicrobiens on a utilisé les antibiotiques de chloramphénicol (30mg / disque), l'amoxicilline (1mg / disque), la vancomycine (30 mg / disque), la tétracycline (30 mg / disque), la ciprofloxacine (5 mg / disque) et de la pénicilline G (UI / disque) selon les recommandations de la clinique et de laboratoire Standards Institut (de Almeida Júnior, Ferrari, et al. 2015).

Une densité cellulaire de 0.5 Mc Farland de turbidité de chaque souche a été préparée et étalée à l'aide d'un écouvillon stérile sur un milieu MHA (Muller Hinton agar). Puis les disques d'antibiotiques ont été appuyés sur la surface de la boîte.

La sensibilité aux antimicrobiens a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition de la croissance bactérienne après une incubation de 42°C pendant 24h.

3.6.3 Activité hémolytique

Un autre critère d'évaluation important est l'activité hémolytique qui est considérée comme une probabilité de sécurité de sélection. Ce phénomène hémolytique du à la rupture de membrane plasmique relative au sous action phosphatidyle-choline estéras ou des molécules provenant la formation des pores membranaires qui libèrent l'hémoglobine (ADIMPONG et al., 2012).

La réaction hémolytique a été évaluée en observant à la fois l'hydrolyse partielle des globules rouges et la production d'une zone verte (α -hémolyse), ainsi que l'hydrolyse totale de globules rouges produisant une zone claire autour de la colonie bactérienne (β -hémolyse) ou pas de réaction (γ -hémolyse).

3.6.4 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm (SD) en trois fois pour chaque échantillon. P valeurs $< 0,05$ ont été considérées comme une différence significative .

Les calculs de moyenne, erreur standard (SE), écart type ont été effectués en soumettant les données à diverses analyses statistiques , en utilisant logiciel (Statistical Software SPSS) version (6.0.1).

Chapitre **4**

Résultats

4.1 Identification des isolats

4.1.1 Dénombrement

Les bactéries lactiques (LAB) thermophiles ont été dénombrées en utilisant deux milieux sélectifs MRS acétique de pH 5.4 ajusté par acide acétique et M 17 additionnée 5% de lactose de pH 7.

Le tableau (4.1) résume le nombre microbien obtenu à partir de différents échantillons. Le dénombrement des isolats présomptifs *Streptococcus* ou *Entérocooccus sp* atteint à (1×10^3) ufc / ml pour le lait de vache , (2.3×10^3) ufc/ml pour le lait de brebis, (1.06×10^4) ufc / ml pour le lait de chèvre et (7.2×10^3) ufc / ml pour le lait de chamelle.

Pour les isolats présomptifs de *Lactobacillus sp* un nombre atteint de (39.5×10^3) ufc/ml pour le lait de vache et (17.2×10^3) ufc/ml pour le lait de brebis, un (7.8×10^3) ufc/ml pour le lait de chèvre, et un (98.2×10^3) ufc/ml pour le lait de chamelle .

D'après les résultats on a constaté que le *Streptococcus* ou *Enterococcus* incubés à 42 ° C sont à moins des *Lactobacillus* à 42 °C et aussi, le nombre de LAB au lait de chamelle est supérieur à un autre lait tel que le lait de brebis.

TABLE 4.1: Dénombrements de LAB à partir des différents échantillons en (cfu/ml)

	vache	brebis	chèvre	chamelle
<i>Streptococcus sp</i>	1×10^3	2.3×10^3	1.06×10^4	7.2×10^3
<i>Lactobacillus sp</i>	39.5×10^3	17.2×10^3	7.8×10^3	98.2×10^3

4.1.2 Isolement et purification

L'isolement et purification des souches lactiques isolées à partir de 20 échantillons de différents laits collectés dans la région, nous a permis d'isoler de 95 souches, 46 souches ont été retenus en raison de leurs critères (Gram positif et catalase négative), le reste des souches ont été écartées.

4.1.3 pré-identification des isolats

4.1.3.1 Aspect macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées sur les milieux solide MRS acétique ,nous a permis d'observer des colonies, muqueuse, blanchâtres, lenticulaires, lises et

réguliers, figure (4.1(a)).

sur le milieu LM17 on a observé de petites colonies de forme ronde punctiforme , muqueuse, figure (4.1(b)). .

4.1.3.2 Aspect microscopique

L'examen microscopique après la coloration du gram de frottis réalisé à partir de colonies apparues, nous a permis d'observer des colonies de forme bacilles, Gram positif , plus ou moins longs isolés, comme ils peuvent être disposés en paires ou en longues chaînettes, c'est le cas des *Lactobacillus sp* (4.2(a)), et des colonies Gram positif de type cocci, disposées en paires, en tétrades en chaînes longues, des coques isolés, ou même en amas, c'est le cas de des *Streptocoques sp* , figure (4.2(b)) .

4.1.3.3 Caractérisation du genre

Les 46 souches isolées (cocci ou bacilles) sont soumises aux différents dépistages physiologiques montrent que :

22 souches cocci sont capables :

- ✓ de se croître à 10° C et 45° C.
- ✓ de pousser en présence de NaCl à 6.5%,4%,2.5% .
- ✓ de pousser au milieu alcalin (PH 9.6).
- ✓ de réduire le lait de sharman à 0.1%, figure (4.3).
- ✓ Produisent du NH₃ à partir de l'arginine.

24 souches bacilles sont incapables.

- ✓ de hydrolyser l'arginine.
- ✓ de hydrolyser l'esculine.
- ✓ de hydrolyser de l'amidon, et de fermenter quelques sucres de clés ,figure (4.5).

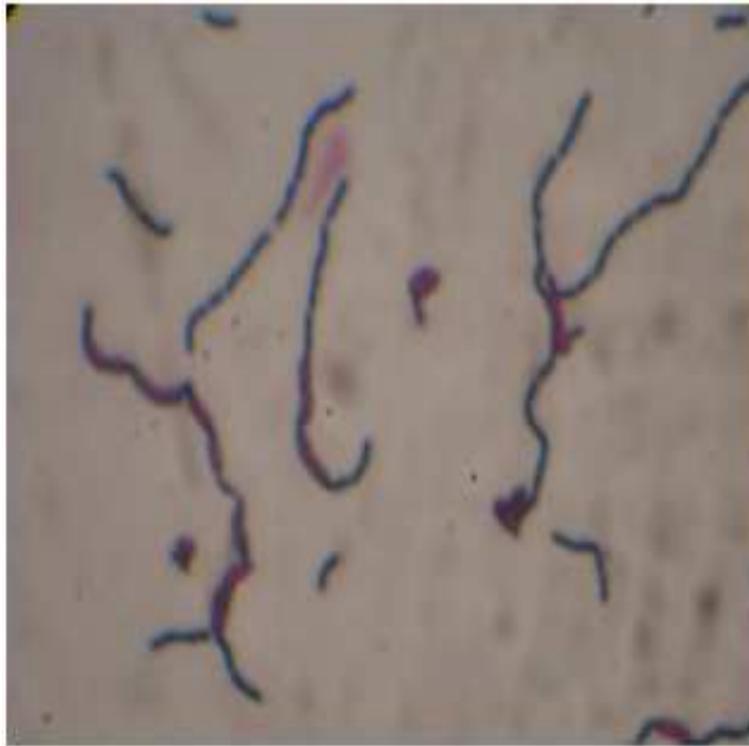


(a)

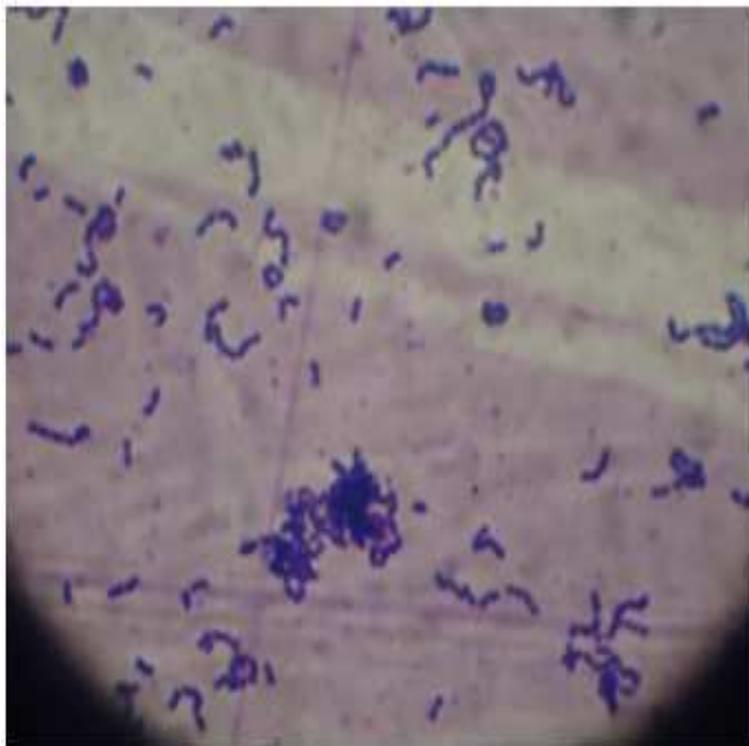


(b)

FIGURE 4.1: Aspect microscopiques des isolats (sur MRS et M17)x40 ((a) *Lactobacilles* (b)*Strptocoques* ou *Entrocoques*).



(a)



(b)

FIGURE 4.2: Aspect microscopique des isolats (x100).((a) *Lactobacillus sp*
(b) *Strptocoques sp*)



(a)



(b)

FIGURE 4.3: Exemple de résultat obtenu pour le test de lait de Sharman à 0.1% des souches examinées .(a) Résultats négatifs, (b) Résultats positifs



(a)

FIGURE 4.4: Exemple de résultat obtenu pour la galerie API Strep de la souche examinée (E1)



(a)

FIGURE 4.5: Exemple de résultat obtenu par galerie API50CHL de la souche examinée (LB1).

Bacterial Identification Program - Lactobacillus species Belgian J Food Chem & Biotech 1987 42 176-183 Maissin et al

File Edit Tools Options Help

Matrix Results Identification Additional Tests

Key LB2 Source laits fermentés Details 20 échantillons (berbie, chèvre, vache,chemelle) Save

Identification threshold 0,999 not reached. The most likely taxa are:

	Taxa	ID Score	ID Modal Score
1	Lactobacillus lactis	0,99623	0,00000
2	Lactobacillus helveticus	0,00312	0,00000

Help

The following 7 tests gave unexpected results for the most likely taxon (ID Score >= 0,05)

Taxa	Test	Result	Matrix Entry
Lactobacillus lactis	Ribose	+	1
Lactobacillus lactis	Rhamnose	+	1
Lactobacillus lactis	Mannitol	+	1
Lactobacillus lactis	Sorbitol	+	1
Lactobacillus lactis	Melibiose	+	25

Bacterial Identification Program - Lactobacillus species Belgian J Food Chem & Biotech 1987 42 176-183 Maissin et al

File Edit Tools Options Help

Matrix Results Identification

Key LB3 Source laits fermentés Details 20 échantillons (berbie, chèvre, vache,chemelle) Save

Identification threshold 0,99900 reached, but a poor match is indicated by the Modal Likelihood

	Taxa	ID Score	ID Modal Score
1	Lactobacillus casei	0,99989	0,00000

Help

The following 15 tests gave unexpected results for the most likely taxon (ID Score >= 0,05)

Taxa	Test	Result	Matrix Entry
Lactobacillus casei subsp.	Nitrate reduction	+	1
Lactobacillus casei subsp.	Glycerol	+	1
Lactobacillus casei subsp.	D-xylose	+	1
Lactobacillus casei subsp.	L-xylose	+	1
Lactobacillus casei subsp.	Adonitol	+	1

Observations on Lactobacillus casei subsp. rhamnosus

The number of isolates used to define this taxon is unknown

FIGURE 4.6: Traitement avec logiciel Pib-Win des résultats obtenus pour les souches identifiées par galerie API 50 CHL et Api strep .

TABLE 4.2: Résultats d'identification phénotypique des souches isolées.

Identifiées comme	Bacilles thermophiles.			Cocci thermophiles		
	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii Subsp lactis</i>	<i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	N=06	N=10	N= 08	N=12	N=08	N=04
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
Morphology	bacille	bacille	bacille	Cocci	Cocci	Cocci
Production of CO ₂ from G	-	+	-	-	-	-
Growth at PH 9.6	-	+	-	-	-	-
Growth at						
10C°	-	-	-	-	-	-
45C°	+	-	-	-	-	-
60C°from 30Min	+	-	-	-	-	-
NaCl	-	+	-	-	-	-
2%	-					
4%	-	+	-	-	-	-
6.5%	-	-	-	-	-	-
Sharman test (1%)	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse of arginine (ADH)	-	-	-	-	-	-
Acetoin (VP)	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse Amidon	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse Esculine		-	-	-	-	-
Acid From						
Starch	-	-	-	-	-	-
Amygladin	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Cellubiose	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	-	-	-	-
Galactose	-	-	+	-	-	-
Glucose	-	-	-	+	+	+
Lactose	-	+	+	-	-	-
Maltose	-	V	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	+	+
Mannose	-	+	-	+	+	+
Melibiose	-	+	+	-	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-	+
Rhamnose	-	+	-	-	+	-
Ribose	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	+	-	-	-
Trealose;	+	-	-	+	-	+
Xylose	-	-	-	-	+	-

+/- : Réaction variable.

- : Réaction négative

+ : Réaction positive

4.1.4 Identification génotypique des souches

4.1.4.1 Extraction l'ADN

Cette étape est caractérisée par l'obtention ADN total qui est en pois moléculaire supérieur à 10 Kb et associée à l'ARN total de la cellule. pour obtenir une ADN pur, il suffit de traiter par l'ARNase.

4.1.4.2 Amplification rep-PCR

L'amplification d'ADN génomique a été réalisée par la méthode rep-PCR en utilisant l'amorce "GTG5" (5'-GTG GTG GTG GTG 3') selon le protocole décrit en partie Matériels et méthodes.

Les photos de 2 gels d'électrophorèse des produits de (GTG)₅-PCR sont présentées dans les figures (4.7) et (4.8).

Sur la figure (4.7), on trouve le gel sur lequel on a chargé les isolats de type bacilles identifiés par API 50CHL comme *LB . bulgaricus* , *LB.lactis* , *Lb .rhamnosus* . La comparaison des profils à l'oeil nu montre que les isolats (B2,B3,B4,B5,B6,B7,B8 et B14), (B11,B12,B13,B9,B15,B16,B17 et B18) et (B20,B21,B22,B23,B24 et B25) ont des profils qui se ressemblent entre eux dans la même groupe et différents des autres isolats dans autre groupe surtout la partie située entre 1200 et 1300 bp , alors que les isolats (B10 et B19) génèrent des profils différents entre eux et différents des autres isolats.

La figure (4.7) montre la photo d'un 2ème gel d'électrophorèse des produits de (GTG)₅-PCR des isolats de type cocci identifiés par API 20 Strep comme étant *Streptococcus thermophilus* , *Enterococcus faecium* , *Enterococcus faecalis* . Sur le gel on remarque que les isolats (B2,B3,B4,B5,B7,B9,B10,B12,B15,B16,B17 et B18) présentent des profils similaires, et différents avec les autres isolats, même chose pour les isolats (B1 et B21), (B6,B8,B13,B14,B9,B11,B19 et B20).

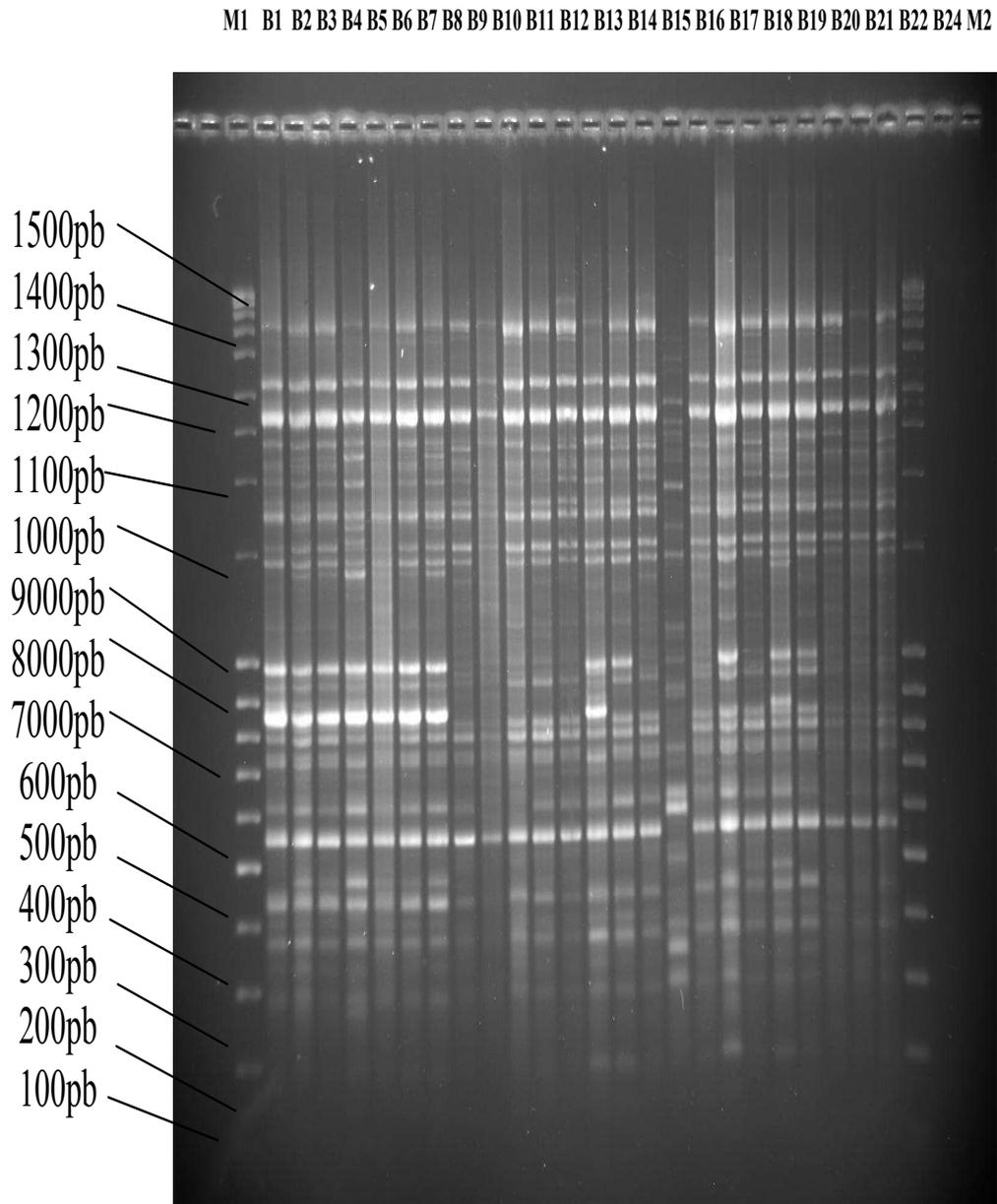


FIGURE 4.7: Gel d'électrophorèse des produits de la $(GTG)_5$ rep-PCR des isolats de type bacille identifiés par API 50 CHL. (M1 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp B2-B24 :les souches identifiés, M2 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp)

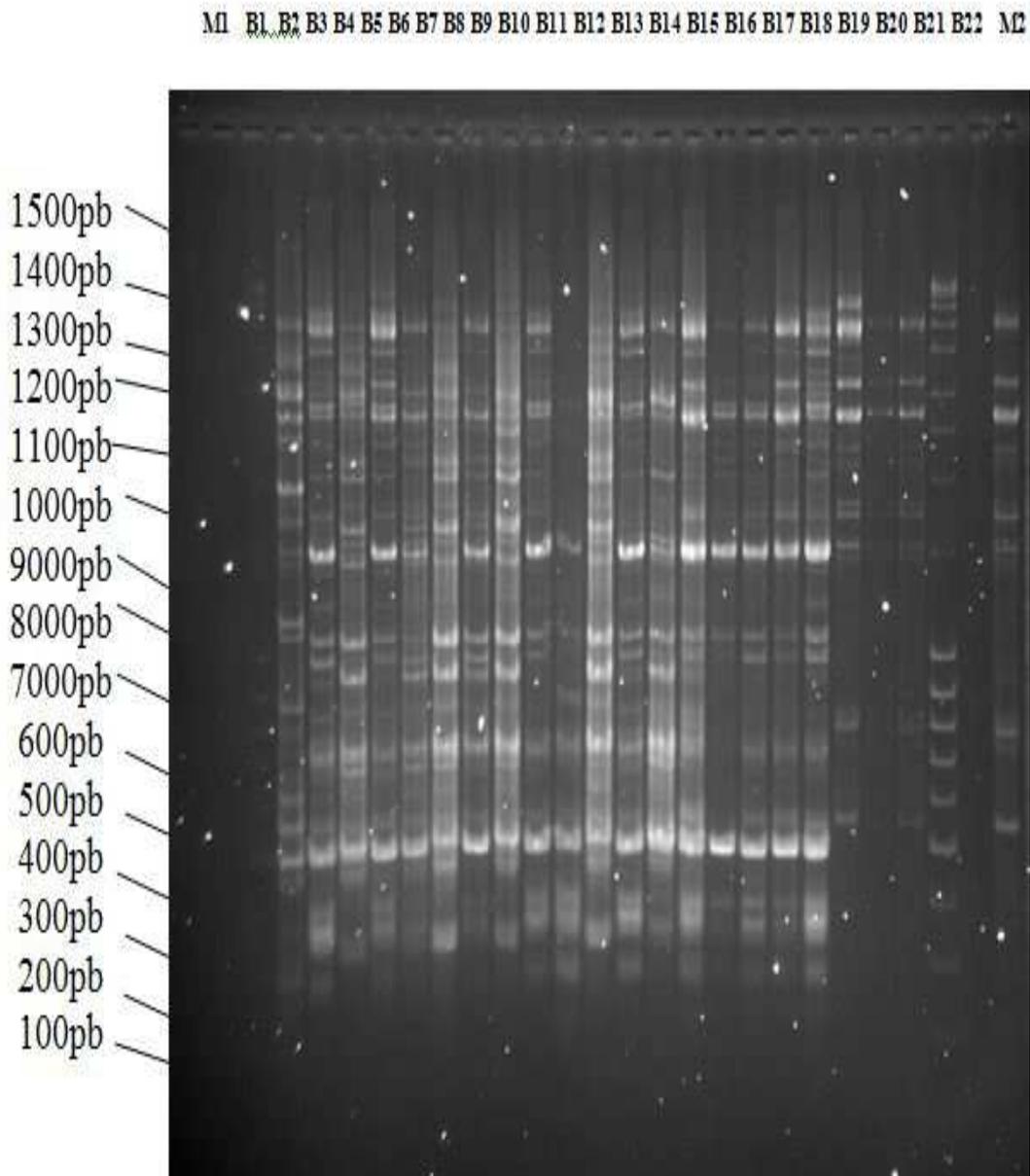


FIGURE 4.8: Gel d'électrophorèse des produits de la $(GTG)_5$ rep-PCR des isolats de type cocci identifiés par API 20 strep. (M1 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp B2-B22 :les souches identifiés, M2 :Marqueur de poids moléculaire 1500bp).

4.1.4.3 Traitement bioinformatique les gels électrophorèses

Puisque la comparaison à l'oeil nu s'avère trop difficile, les gels électrophorèses obtenus contenant des bandes fluorescentes ont été traités par logiciel bioinformatique (bioinformatics 1.45) qui nous a permis d'analyser avec précision les différents gels obtenus et de mieux évaluer les ressemblances entre les différents profils et regrouper nos souches selon la similitude de ces profils.

D'après les dendrogrammes illustrés dans les figures (4.9) et (4.10), on remarque qu'effectivement les isolats montrent des profils très différents.

La comparaison des profils nous a permis de organiser les isolats de type bacille en 5 groupes et les isolats de type cocci en 3 groupes. L'attribution d'un isolat à une espèce définie est basée sur son degré de similitude avec les différentes souches de l'espèce.

Les 5 groupes des isolats de type bacille identifiés (voir la figure (4.9)) ont été attribués aux espèces suivantes : (groupe I :06 isolats), (groupe II :08 isolats), (groupe III :01 isolats), (groupe IV :08 isolats), (groupe V :01 isolats).

D'autre part les groupes de type des isolats cocci (voir la figure (4.10)) ont été attribués aux 3 espèces suivantes : (groupe VI :12 isolats), (groupe VII :02 isolats), (groupe VIII :08 isolats).

4.1.4.4 Séquençage et traitement bioinformatiques

Les produits d'amplification finale du PCR des souches sélectionnées et représentées de chaque groupe identifié par de rep-PCR ont été purifiées et envoyées au service de Macrogen.

Les séquences obtenues de forme de chromatogramme ont subi au traitement à l'aide de programme Chromas version 1.45 (Applied Maths, Kortrijk), c'est un programme informatisé pratique pour le traitement des séquences, ce dernier permet de couper les bases nucléotides endommagés afin d'obtenir les séquences correctes et complètes comme présentés la figure (4.11).

Ces séquences ont été comparées avec celles de la base des données NCBI.

Les figures (4.13, (4.14); (4.15), (4.22), (4.17) présentent les étapes suivies pour le traitement des séquences au niveau de la base (NCBI).

Les analyses de séquences de service (NCBI) ont permis de confirmer l'identification exacte de nos souches isolées.

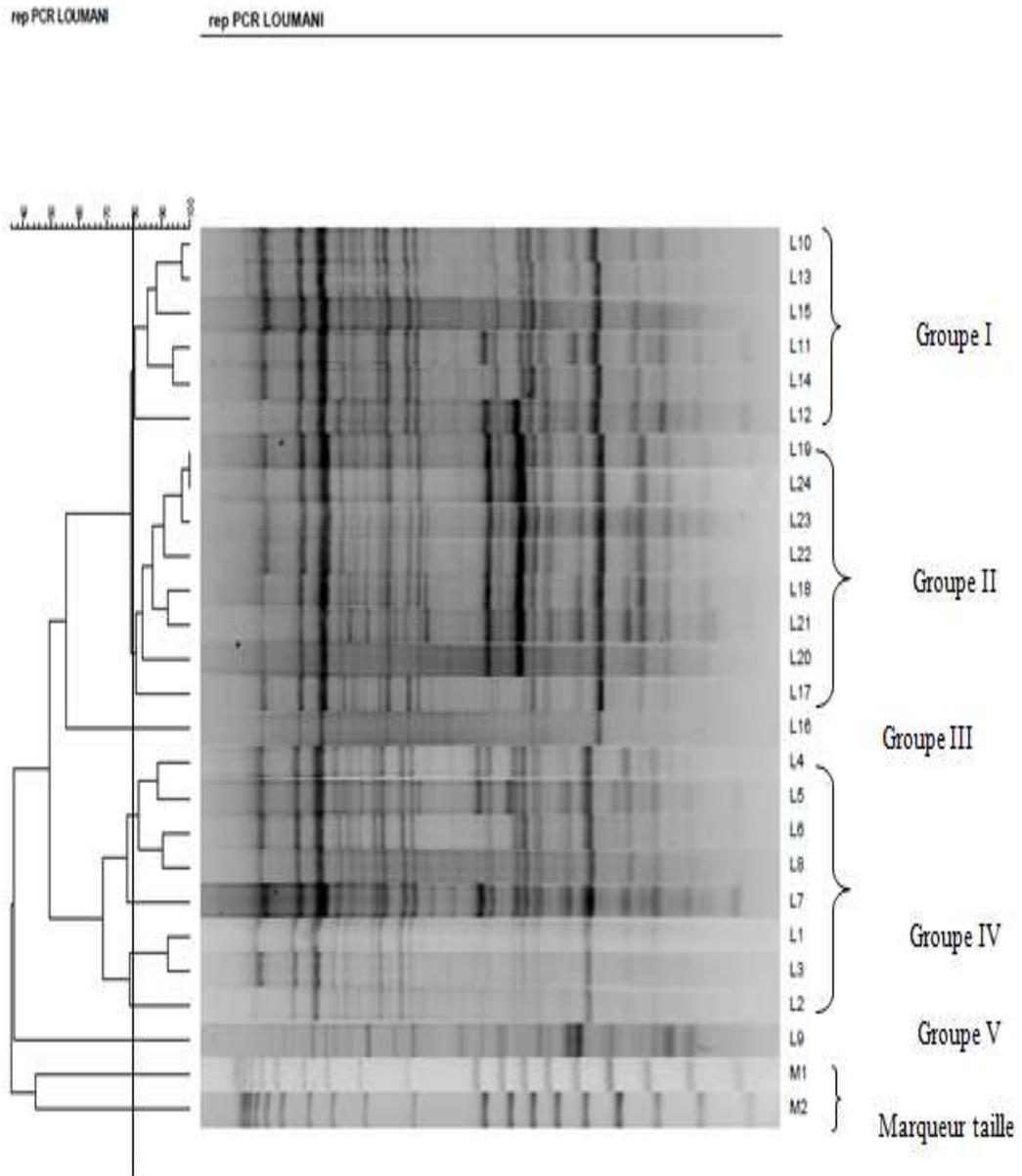


FIGURE 4.9: Dendrogrammes et profils $(GTG)_5$ rep-PCR de isolats bacilles chargés sur le gel de la figure (4.1).

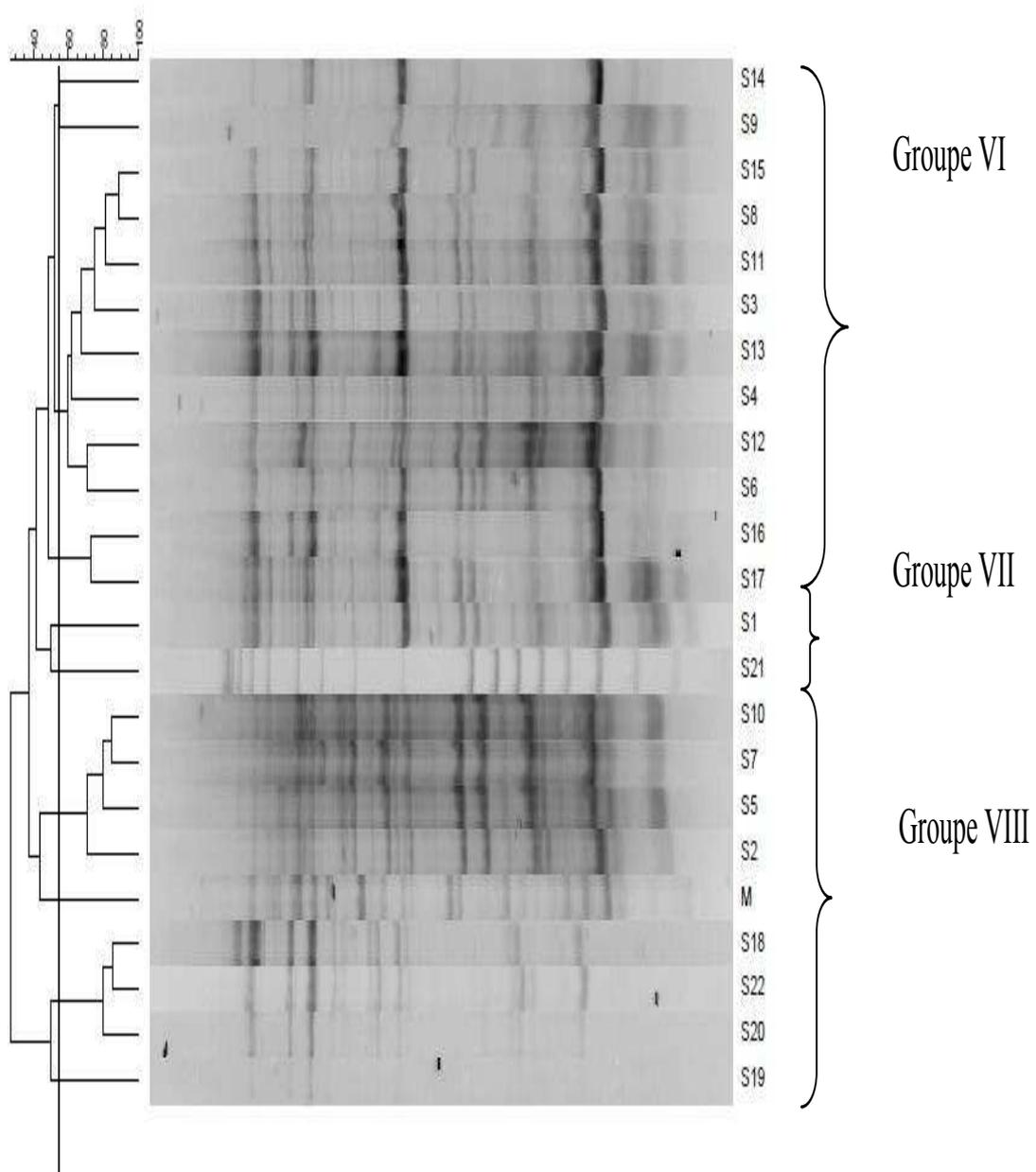


FIGURE 4.10: Dendrogrammes et profils $(GTG)_5$ rep-PCR de isolats cocci chargés sur le gel de la figure (4.2).

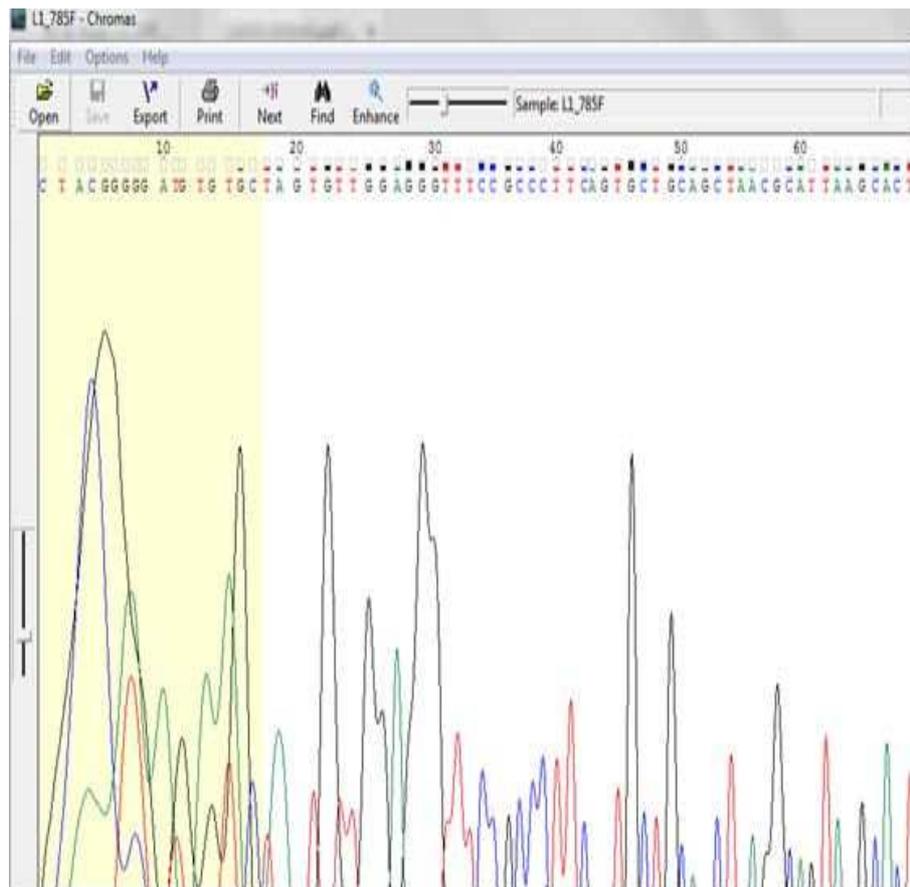


FIGURE 4.11: Traitement avec logiciel d'édition et correction chromas de chromatogrammes pour les séquences de gène 16S rDNA de la souche (LB1) .

- Les pics verts :représente les Nucléotides de la base A.
- Les pics rouges :représente la les nucléotides de la base T.
- Les pics noires :représente les Nucléotides de la base G.
- Les pics bleues :représente les Nucléotides de la bases C.

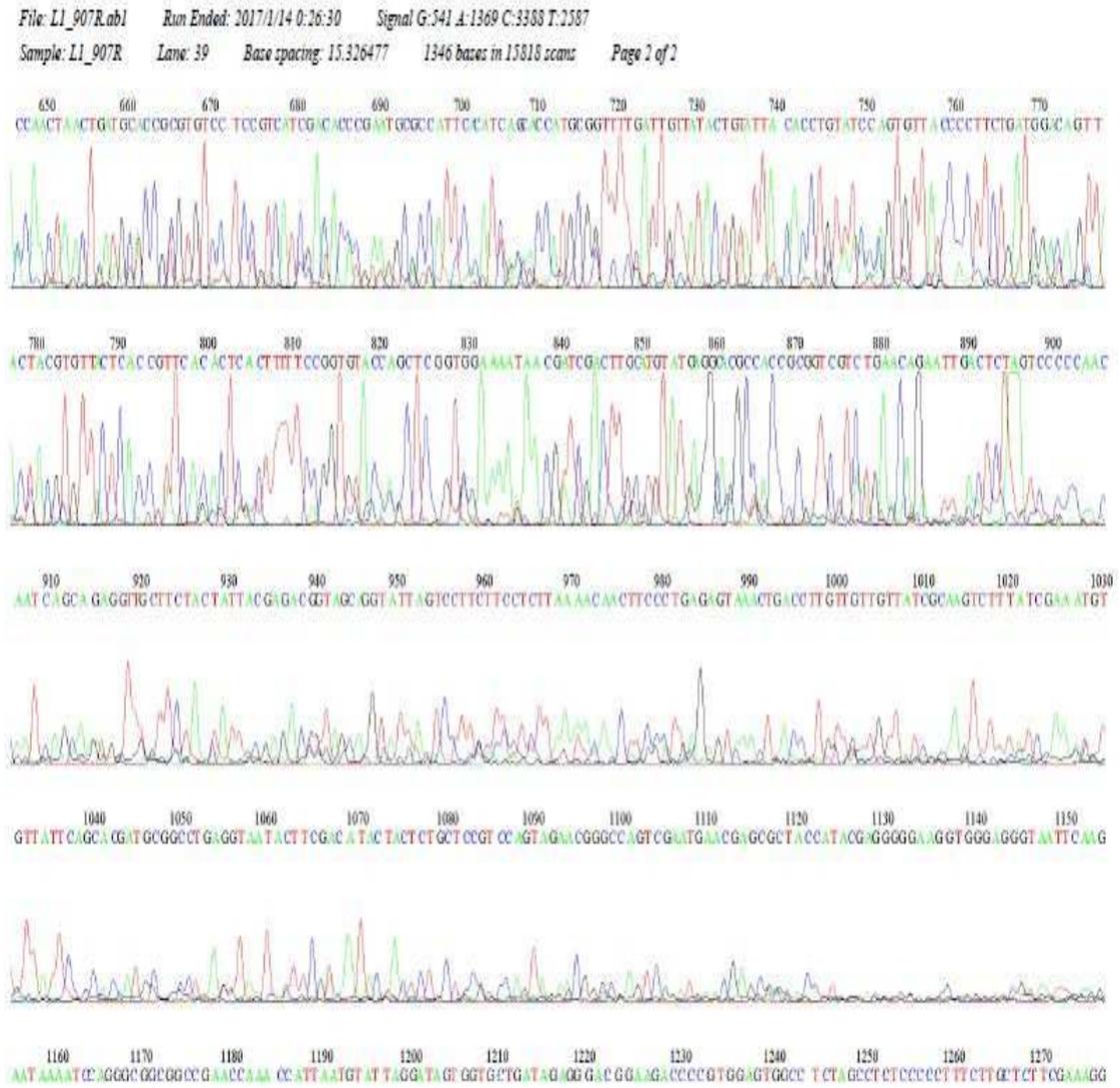


FIGURE 4.12: Séquence du produits fini de PCR forward (27F) 5'-3' de la souche (LB1) après le Traitement par logiciel chromas V version 1.45 .

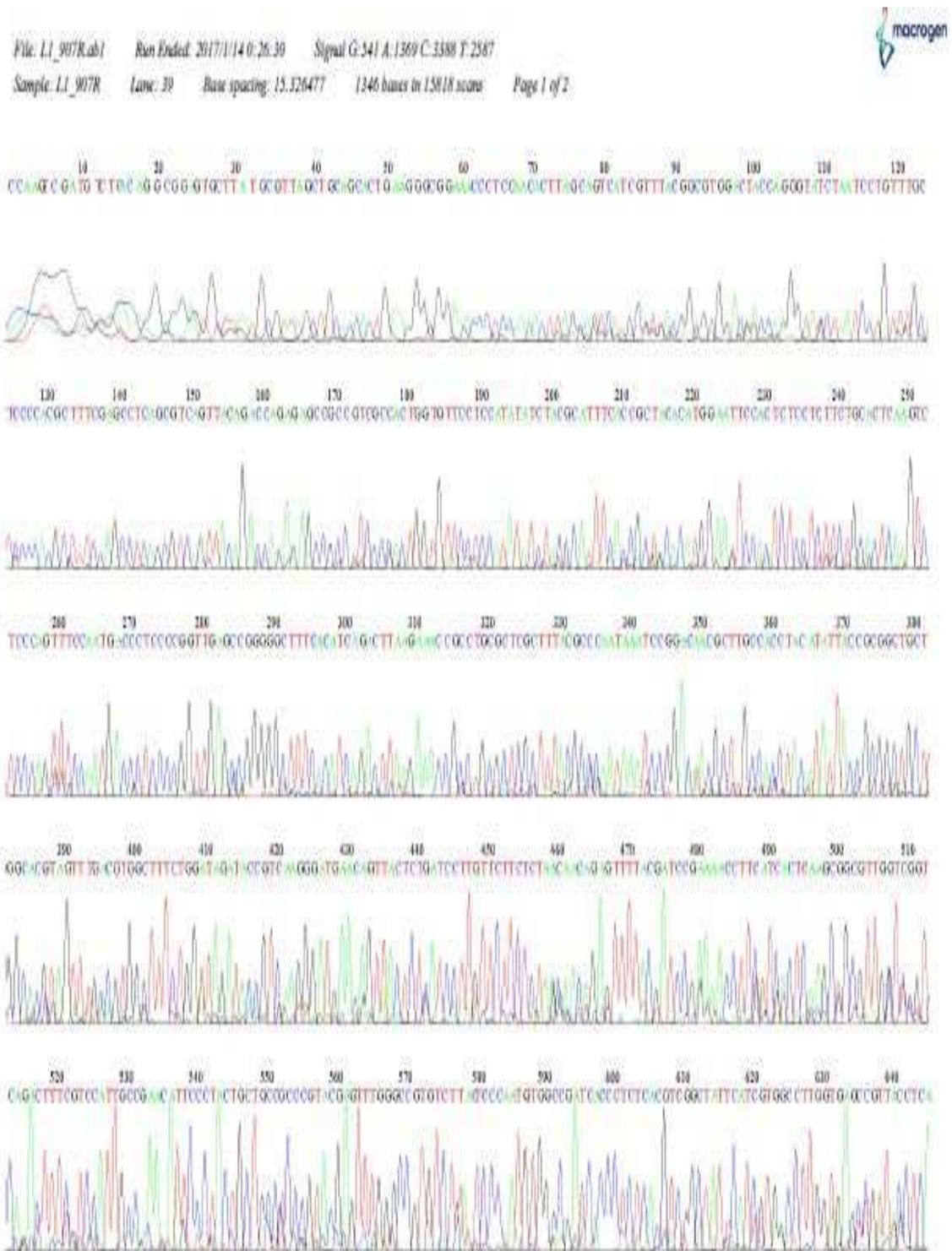


FIGURE 4.13: Séquence du produits fini de PCR reverse (1492R) 3'-5' de la souche (LB1) après le traitement par logiciel .

U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

BLAST » blastn suite | Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

Standard Nucleotide BLAST

Enter Query Sequence: BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) | [Reset page](#) | [Bookmark](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) | Clear | Query subrange | From: | To: |

Or, upload file | Choose File | No file chosen | Job Title: | Enter a descriptive title for your BLAST search |

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database: Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr) |

Limit by: Organism BioProjectID WGS Project | Exclude |

Exclude Optional: Modals (XMXF) Uncultured/environmental sample sequences |

Limit to Optional: Sequences from type material |

Entrez Query: | [YouTube](#) | [Create custom database](#)

FIGURE 4.14: La Soumission des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant le service NCBI (BLAST) .

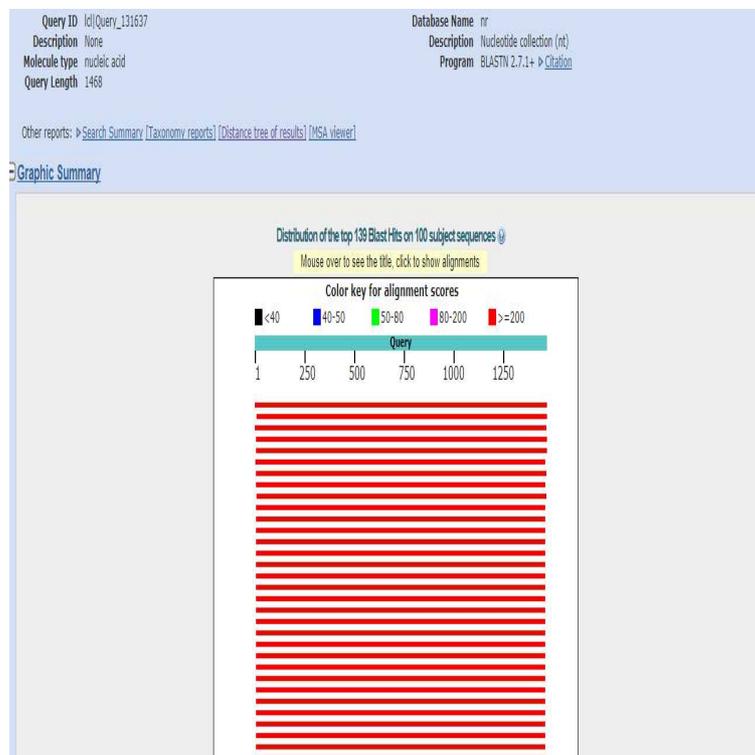


FIGURE 4.15: Exemple de résultat obtenu du graphique d'alignement d'une séquence du gène 16 rDNA en utilisant le service BLAST de NCBI .

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2712	2712	100%	0.0	100%	MG551108.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2678	2678	99%	0.0	99%	MG551096.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1429 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2673	2673	99%	0.0	99%	MG551092.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1441 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2671	2671	99%	0.0	99%	MG551105.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1440 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2671	2671	99%	0.0	99%	MG551104.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2671	2671	99%	0.0	99%	JX839763.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	99%	0.0	99%	MG551099.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain MGCA-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2663	2663	99%	0.0	99%	HM058302.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1328 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2662	2662	99%	0.0	99%	MG550987.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain ND04, complete genome	2662	23870	99%	0.0	99%	CP016393.1

FIGURE 4.16: Exemple de Résultat descriptif obtenu des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant service BLAST de NCBI .

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MG551108.1](#) Length: 1468 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1468 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2712 bits(1468)	0.0	1468/1468(100%)	0/1468(0%)	Plus/Plus

Query 1 6GCCGGGGGGGGTCTATAATGCAAGTCGAGCGAGCTGGAATTCAGAGATCCCTTCGGGGT 60
Sbjct 1 6GCCGGGGGGGGTCTATAATGCAAGTCGAGCGAGCTGGAATTCAGAGATCCCTTCGGGGT 60

Query 61 GATTTGTTGGACGCTAGCGCGGATGGGTGAGTAAACAGCTGGCCAACTGCCCTAAAGAC 120
Sbjct 61 GATTTGTTGGACGCTAGCGCGGATGGGTGAGTAAACAGCTGGCCAACTGCCCTAAAGAC 120

Query 121 TGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACCAACATGATCGCATGATTCAA 180
Sbjct 121 TGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACCAACATGATCGCATGATTCAA 180

Query 181 GTTTGAAAAGCGCGGTAGCTGTCTACCTTAAAGATGAGCCCGCGCCGATTAAGCTAGTTGG 240
Sbjct 181 GTTTGAAAAGCGCGGTAGCTGTCTACCTTAAAGATGAGCCCGCGCCGATTAAGCTAGTTGG 240

Query 241 TGGGTAAGAGCCCTACCAAGGCAATGATGCTAGCGCGAGTGGAGGACTGATCGCCACCA 300
Sbjct 241 TGGGTAAGAGCCCTACCAAGGCAATGATGCTAGCGCGAGTGGAGGACTGATCGCCACCA 300

Query 301 TTGGGACTGAGACACCGCCCAAATCTCTACGGGAGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAAT 360
Sbjct 301 TTGGGACTGAGACACCGCCCAAATCTCTACGGGAGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAAT 360

Query 361 GGACCGAAGTCTGATGGAGCAACCGCCGGTGAAGTGAAGAGGTTTTTCGATCGTAAAGCT 420
Sbjct 361 GGACCGAAGTCTGATGGAGCAACCGCCGGTGAAGTGAAGAGGTTTTTCGATCGTAAAGCT 420

Query 421 CTGTTGTTGGTGAAGAGGATAGAGGCAAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCA 480
Sbjct 421 CTGTTGTTGGTGAAGAGGATAGAGGCAAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAAATCAACCA 480

Query 481 GAAAGTCACCGCTAACTACGTCGACAGCCCGGTAATACGTAAGTGGCAAGCGTTGTC 540
Sbjct 481 GAAAGTCACCGCTAACTACGTCGACAGCCCGGTAATACGTAAGTGGCAAGCGTTGTC 540

Query 541 CGGATTTATTGGCGGTAAGCGAGCGAGCGGAAATGATAGTCTGATGTGAAGGCCAC 600
Sbjct 541 CGGATTTATTGGCGGTAAGCGAGCGAGCGGAAATGATAGTCTGATGTGAAGGCCAC 600

Related Information

FIGURE 4.17: Exemple de résultat descriptif obtenu d'alignement des séquences du gène 16S rDNA de la souche (LB1) en utilisant le service Blast de NCBI .

Les résultats d'identification génotypique des isolats sélectionnés en utilisant le séquençage 16 rDNA montrent que :

Les 24 isolats de bacilles étudiés sont attribués en quatre espèces et sous- espèces :

⇒ **Groupe I** (06 isolats : *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*)

⇒ **Groupe II** (08 isolats : *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis*),

⇒ **Groupe III** (01 isolats : *Bacillus subtilis*)

⇒ **Groupe IV** (08 isolats : *Lactobacillus subsp rhamnosus*)

⇒ **Groupe V** (01 isolats : *Bacillus cereus*).

sauf deux souches du groupe III et groupe V qui sont prouvées la divergence avec les souches des bactéries lactiques portant leurs caractères sont près de ces souches. D'autre par, les 22 isolats cocci sont attribués dans trois espèces et sous- espèces à savoir :

⇒ **Groupe VI** ((12 isolats : *Enterococcus faecium*)

⇒ **Groupe VII** (2 isolats : *Streptococcus thermophilus*) .

⇒ **Groupe VIII** (8 isolats : *Enterococcus faecalis*).

Enfin, en comparant entre l'identification phénotypique et génotypique ,il s'avère que la plupart des souches ont données des séquences confirmer le pourcentage d'identification phénotypique à l'exception de quelques qui souches sont mal identifiées, ce qui confirme que l'identification phénotypique ne donne pas une identification fiable et précise et aussi que l'étape génotypique est indispensable pour leur identification.

4.2 Analyse phylogénique et moléculaire des souches

La réalisation d'alignement complète des séquences a été effectuée pour les 46 souches obtenues lors de cette étude en utilisant le programme MEGA7, à l'aide de ce programme, on a construit deux arbres phylogéniques en utilisant l'algorithme Neighbor-joining et en établissant ainsi la relation phylogénique entre les différentes souches, les figures (4.18),(4.19),(4.20),(4.21) montrant les étapes suivies pour la réalisation de ces arbres.

Les figures (4.20) , (4.21) représentent les arbres phylogéniques de 46 souches isolées et identifiées précédemment.

L'analyse phylogénétique de la figure (4.20) indique que les souches (L1,L4,L5,L8,L7, L3,L2,L6) ont été placées dans un groupe composant le espèce *Lactobacillus rhamnosus*.

Les souches (L2,L6,L4,L1) forment une branche de valeur de bootstrap de 74% entre eux , le reste des souches (L7,L3,L2,L6) ont formé une autre branche à une valeur

de bootstrap de 69%.

Les souches (L15,L11,L12,L14,L10,L13) se mettent ensemble dans un groupe unique à valeur de bootstrap de 100% en composant l'espèce *Lactobacillus bulgaricus*.

Le troisième groupe s'est formé sur l'arbre phylogénique avec les séquences du gène 16S rDNA des souches (L18,L21,L21,L20,L17,L23,L24,L1,L9) composant les souches *Lactobacillus lactis* et *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

Les souches (L18,L21,L21,L20,L17,L23,L24) s'identifient physiologiquement à *Lactobacillus lactis* forment une branche avec valeur de booststap de 89% , la souche L1 lui même composé une branche à une valeur de booststrap de 98% et ainsi la souche L9 qui est lui même composé une branche à une valeur de booststrap de 86%. L'analyse de l'arbre phylogénique de la figure (4.21) indique que les 22 souches de formes cocci composées de trois groupes à savoir :

Les souches (S15,S14,S9,S8,S11,S12,S6,S17,S3,S16,S4,S13) se mettent ensemble dans un groupe de monophylie à une valeur de 100%, en composant les souches *Enterococcus faecium*.

Deuxième groupe s'est formé sure cette l'arbre par les souches (S10,S5,S7,S2,S22,S20, S20,S19,S18) en composants les souches *Enterococcus faecalis*.

Le dernier groupe est représenté sur l'arbre phylogénique par les deux souches S1et S21 en composant les souches *Streptococcus thermophilus* de valeur de booststap de 100%.

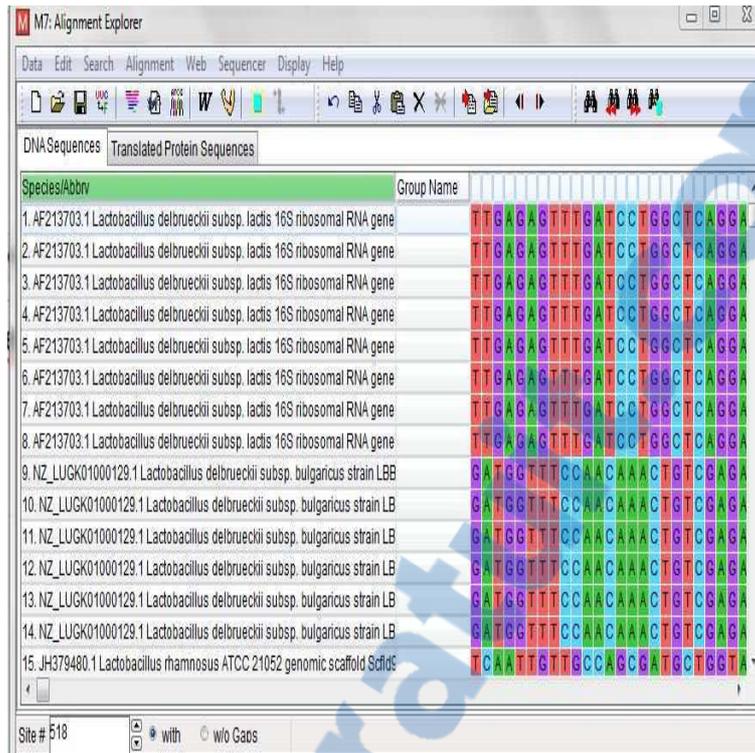


FIGURE 4.18: Exemple de résultat obtenu d'alignement les séquences du gène 16S rRNA des souches identifiés en utilisant MEGA7 .

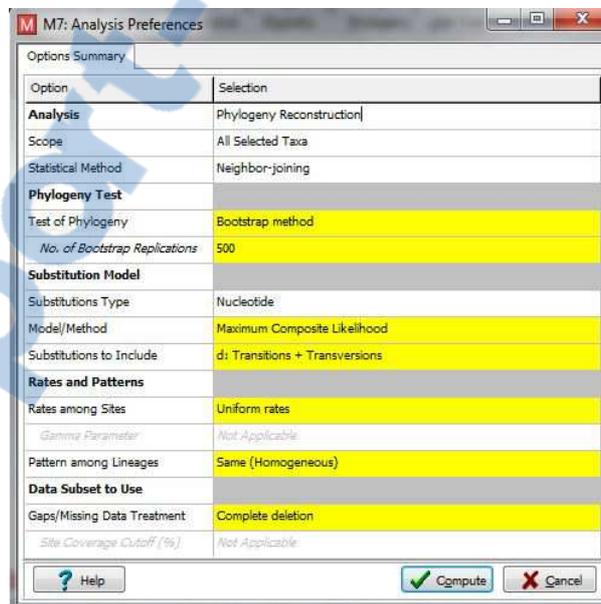


FIGURE 4.19: Exemple de résultat obtenu de Calculer la divergence et la diversité évolutive des séquences du gène 16S rRNA des souches identifiés en utilisant logiciel MEGA7 .

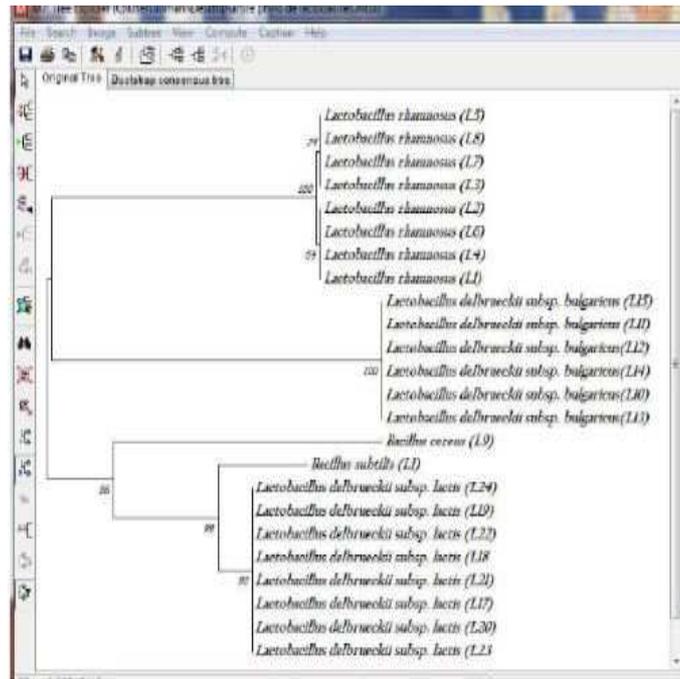


FIGURE 4.20: Arbre phylogénétique des souches de *Lactobacillus sp* en utilisant la méthode Neighbor-joining .

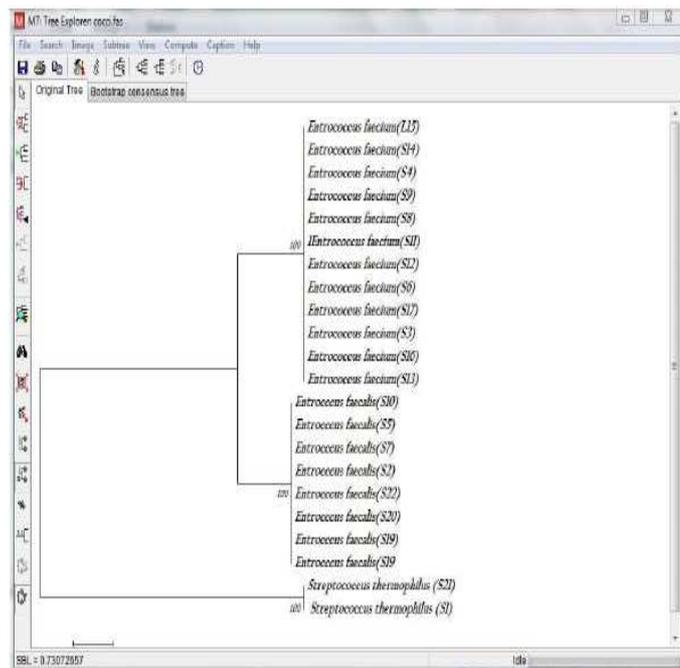


FIGURE 4.21: Arbre phylogénétique des souches de *Enterococcus sp* et *Streptococcus thermophilus* en utilisant la méthode Neighbor-joining .

4.3 Caractérisation des aptitudes technologiques

4.3.1 Pouvoir acidifiant

L'acidification du lait est une aptitude la plus intéressante dans l'industrie alimentaire, cette acidification est due à la production de l'acide lactique qui est indispensable dans la conservation et la coagulation du lait. Cette production variée d'une souche à l'autre .

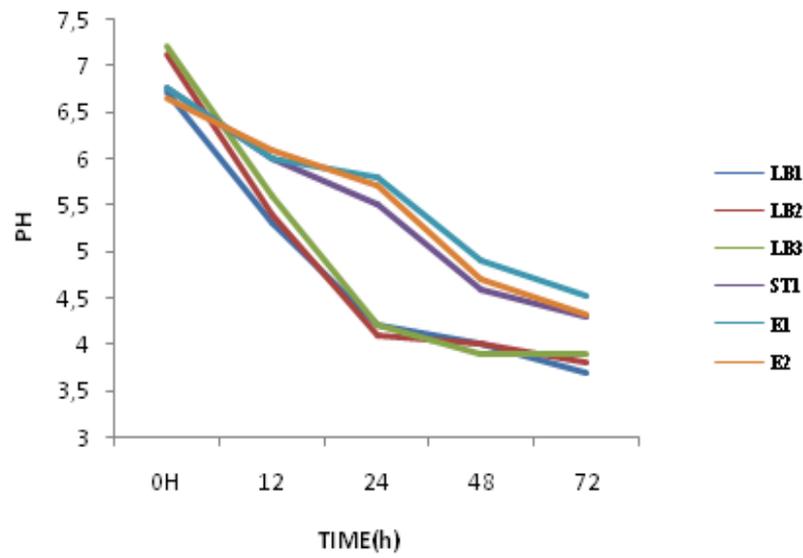
Les résultats de l'acidité montrent que les souches testées ont un pouvoir acidifiant, cela est constaté à partir de l'acidité acquise et l'observation du pH après 6 d'incubation à 42°C. Ces résultats sont mentionnés dans le tableau (4.3) et dans la figure (4.22).

La production d'acide lactique est rapide chez des souches de *Lactobacilles* (LB1, LB2, LB3) de taux varié entre 69°D et 75°D après 3 h d'incubation seulement , et suivie par la souche ST1(*Streptococcus thermophilus*) de taux de production moyen qui atteint de 48°D après 48 d'incubation , au contraire, les souches E1, (*Ent. faecium*), E2(*Ent. faecalis*) sont faible production de d'acide lactique de taux variée entre 43°D et 49°D jusqu'à 72 heures d'incubation .

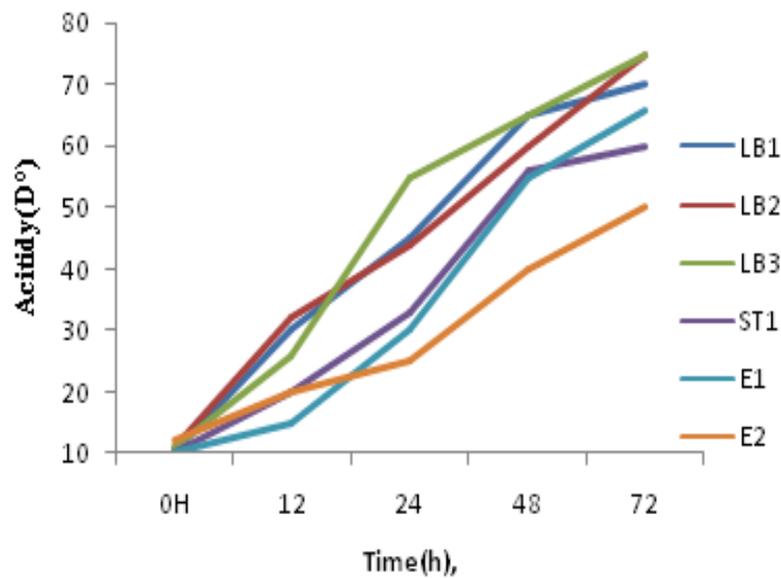
La fermentation du lait provoque l'abaissement du pH de façon proportionnelle à l'acidité produite. le pH varie en milieu lait écrémé entre le 7 à 4,2 pour les *Lactobacilles* et de 3,7 pour le *Streptocoques* et de 7 ,5,3 pour les *Entrocoques* .

TABLE 4.3: d'acidité et PH après 72 d'incubation .

Souches	L'acidité en (D°)	PH
LB1	70	4.6
LB2	75	4.3
LB3	69	4.8
ST1	59	4.9
E1	43	5.8
E2	49	5.2



(a)



(b)

FIGURE 4.22: Evolution de l'acidité et le PH en D° dans lait écrémé des LAB incubé à $42C^\circ$. (LB1 : *Lb. bulgaricus*, LB2 : *Lb. lactis* . LB3 : *LB. rhamnosus*. ST1 : *Streptococcus thermophilus* E1 : *Enterococcus faecejum* , E2 : *Enterococcus faecalis*).

4.3.2 L'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été estimée par l'ensemencement en touche des souches lactiques sur milieu spécifique MRS additionné de lait écrémé à 1% solide en mesurant la croissance par la dimension d'halo clair autour de la colonie.

Les résultats obtenus ont montré que la plupart des souches étudiées possèdent une activité protéolytique sur le milieu au lait écrémé .

Les diamètres des halos enregistrés varient entre 0 mm et 20 mm pour l'ensemble des souches comme indique le tableau (4.4), d'après les résultats mentionnées dans ce tableau . On a constaté que toutes les souches étudiées ont un pouvoir activité protéolytique à l'exception de la souche (E2) qui a prouvée le contraire, aussi on a remarqué que cette activité est variable d'une souche à l'autre, A cet égard les souches ont classé en trois catégories :

✓ **Classe 1** : Les souches fortement protéolytiques sont représentées par LB1(*Lb bulgaricus*), LB2(*Lb lactis*), LB3(*Lb rhamnosus*) qui ont formé des halos clairs autour des colonies de dimensions varient entre 20.2 et 21.3 mm,figure (4.23).

✓ **Classe II** :Les souches moyennement protéolytique sont représentée par la souche ST1(*Streptococcus thermophilus*) de diamètre de 14.43 mm.

✓ **Classe III** : Les souches faiblement protéolytiques sont présentées par E1(*Ent faecium*),E2(*Ent faecalis*) de diamètre 10.4, 2.0 mm, respectivement .

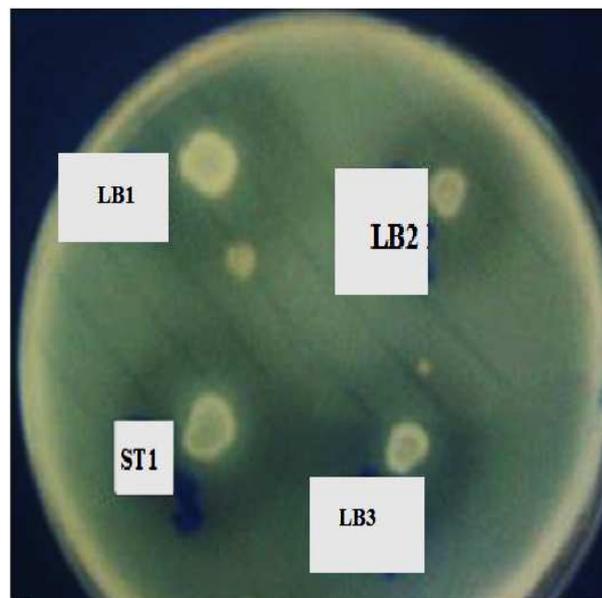


FIGURE 4.23: Résultat de l'activité protéolytique des souches testées. LB1 : *Lb. bulgaricus*, LB2 : *Lb. Lactis*.LB3 : *Lb. rhamnosus*, ST1 : *Strptococcus thermophilus*

TABLE 4.4: Activité protéolytique des souches étudiées avec l'évaluation de l'zone hydrolyse .

codes	souches	Diamètre (mm)	Evaluation
LB1	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> ,	21,3±0,1	+++ (Très bon)
LB2	<i>Lactobacillus delbrueckii Subsp. lactis</i>	20,66± 0,3	+++ (Très bon)
LB3	<i>Lactobacillus Casei subsp rhamnosus</i>	20,2± 0,2	+++ (Très bon)
ST1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	14,43±0,5	++ (Bon)
E1	<i>Enterococcus faecium</i>	10,4±0,3	+ (faible)
E2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2±0,1	-(Negative)

– :Zone d'activité protéolytique dont le diamètre est $< 2mm$.

+ :Zone d'activité protéolytique dont le diamètre est compris entre : 5-10 mm.

++ :Zone d'activité protéolytique dont le diamètre est compris entre : 10-20 mm.

+++ :Zone d'activité protéolytique dont le diamètre ≥ 20 mm .

Les moyenne \pm trois expérience indépendantes sont indiquées.

4.3.3 La mise évidence l'activité antagonisme

Plusieurs études ont confirmé l'activité antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes à l'exemple de (*E. Coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*).

Les propriétés antimicrobiennes des LAB dépendent de plusieurs critères à savoir : L'acidité de milieu qui joue un rôle considérable de la capacité inhibitrice contre les bactéries pathogènes.

Le milieu de croissance et la production des substances comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène .

Les résultats de l'interaction in vitro des bactéries lactiques vis -à- vis les bactéries pathogènes sont présentés dans le tableau(4.5) et la figure(4.24) .

D'après les résultats obtenus , il en ressort que l'inhibition la plus importante est remarqué chez les souches LB1(*Lb . bulgaricus*) et LB2(*Lb. lactis*) vis- à-vis *E coli* et *Listeria monocytogenes* dont les diamètres enregistrés sont de 5.4 mm et 5.2 mm avec la souche *E .coli* et 5.2 mm,4.1 mm avec la souche *S. areus* et 5.1 mm,

4.1 mm avec la souche *L.monocytogenes*. Pour les souches LB3(*Lb.rhamnosus*) et ST1(*Streptococcus thermophilus*), les meilleurs zones d'inhibition enregistré sont 4.9 mm,4.2 mm avec la souche *E. coli* et à diamètre de 3.8 mm,2.3 mm avec la souche *S.areus*.

Les résultats d'inhibitions des souches pathogènes montrent que les bactéries lactiques ne possèdent pas même spectre d'action,elles expriment des variations plus au moins importantes qui dépendent la souche cible et la souche indicatrice de bactéries lactiques , les meilleurs zones d'inhibition ont été enregistrées avec les souches *Lactobacilles* dont ces souches ont montré un pouvoir acidité élevé avec la sécrétion de acide lactique de quantité égale à 70°D ceci ,confirme que l'inhibition est due à la sécrétion de l'acide lactique.

TABLE 4.5: Diamètre des zones d'inhibition des 6 souches vis-à-avis les trois souches pathogènes.

Les souches	<i>E.coli</i>	<i>S.areus</i>	<i>L.M</i>	Evaluation (mm)
LB1	5,4±0,1	5,2±0,2	5,1±0,05	+++
LB2	5,2 ±0,2	4,1±0,07	4,1±0,1	+++
LB3	4,9±0,05	4,6 ±0,1	3,1±0,2	+++
ST1	4,2±0,2	3.8±0,1	4.1±0,1	+++
E1	2±0,07	2.3±0,3	2.2±0,3	+
E2	00±00	00±00	00±00	-

+ :zone de diamètre ≥ 2 mm. - :zone de diamètre < 2 mm



FIGURE 4.24: Exemple de Résultat obtenu de l'activité antagonisme des souches vis-à-vis E.coli LB1 : *Lb. bulgaricus*, LB2 : *Lb. lactis*.LB3 : *Lb. rhamnosus*, ST1 : *Strptococcus thermophilus* .

4.3.4 Antibiogramme

Les résultats obtenus sont présentés au tableau (4.6) et à la figure (4.25) montrent que la souche (LB1) est résistante aux rifampine($5\mu g$) et ciprofloxacine ($5\mu g$) et vancomycine et Tétracycline($30\mu g$) et sensible à pénicilline G ($10U$) et à vancomycine 30 mg ,la souche LB2 est résistance à tous antibiotiques testés , aussi la souche (LB3) est résistante aux colistine,ciprofloxacine ($5\mu g$), pénicilline G ($10U$),vancomycine 30 mg et intermédiaire aux rifampine($5\mu g$) et Tétracycline($30\mu g$).Ensuite les souches E1,E2 sont résistant aux rifampine($5\mu g$),colistine 10 mg, ciprofloxacine ($5\mu g$),pénicilline G ($10U$),Vancomycine 30 mg et intermédiaire à Tétracycline($30\mu g$).

TABLE 4.6: Résultat de l'antibiogramme des souches vis-à-vis les antibiotiques utilisés .

Les souches	les Antibiotiques utilisés					
	<i>RI</i>	<i>CT</i>	<i>CIP</i>	<i>TE</i>	<i>P</i>	<i>V</i>
LB1	9	1	10	00	22	21
LB2	11	12	5	00	00	2
LB3	15	3	3	15	00	00
ST1	3	2	3	00	24	12
E1	12	00	8	16	7	11
E2	3	00	2	15	9	13

S \geq 20mm. 15mm>I<20mm. R : \leq :15mm

RI :Rifampine . CT : Clolistine . CIP :Ciprofloxacine. TE :Tetraciline.

P :peniciline G . V :vancomycine.

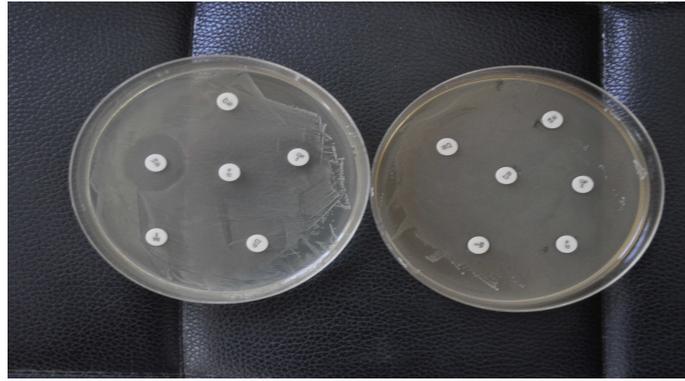


FIGURE 4.25: Exemple de résultat de l'antibiogramme obtenu pour souche (LB1) et (LB2) .

4.3.5 Production de diacétyl

La production de diacétyl par LAB à partir de différents laits crus était différente d'une souche à l'autre , les souches LB1(*LB.bulgaricus*) et LB2(*LBrhamnosus*) ,LB3(*LB lactis*)) présentent une forte production de diacétyl par contre les autres souches ST1 (*St thermophilus*) ,E1(Ent faecium) ,E2(Ent feacalis) présentent une faible production. La diacétyl (2,3-butanedione) est un produit volatil du métabolisme citrate qui produite par certains LAB et contribue directement à la formation de saveurs, et aussi qui correspondent une caractéristique d'une grande importance industrielle,figure(4.26).

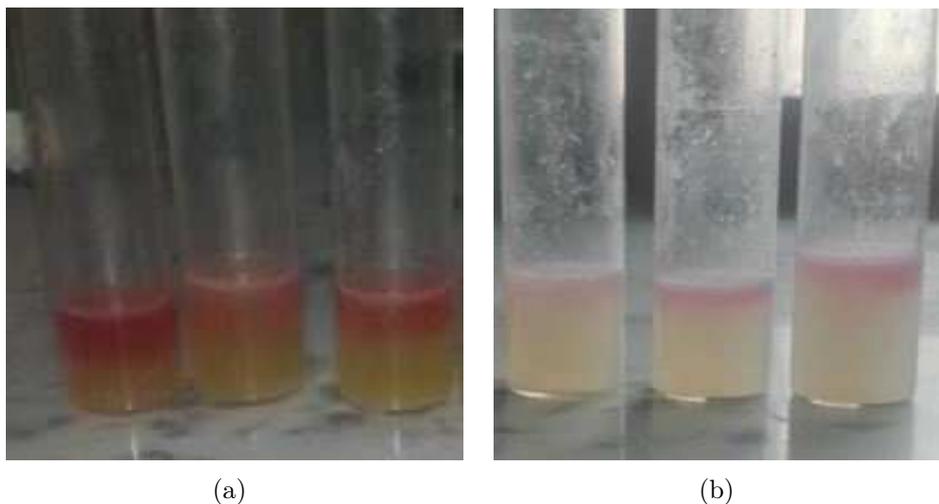


FIGURE 4.26: Résultats de production diacétyl (a) (LB1, LB2, LB3) (b) :(E1 E2, ST1) .

4.3.6 Production EPS

Les EPS produite par les bactéries lactiques ont fait l'objet de beaucoup de recherches, en raison de leurs propriétés immunogènes , leurs rôle dans la texture de les produits laitiers fermentés .

La production d' EPS par isolats LAB variée de 5 mg / L à 30 mg / L de moyenne de de 17,50 mg / L. Les résultats obtenus montrent que la souche présentant la plus forte productrice est ST1 (*S.thermophilus*) de taux de production arrive jusqu'à 30 mg/l ,d'autre part les souches présentant les moins productrices d'EPS sont LB1 (*Lb.bulgaricus*) ,LB2(*Lb.rhamnosus*) et LB2 (*Lb.lactis*) avec un taux de 12 mg/l,11 mg/l et 10 mg/l, respectivement, par contre les souches E1 (*Ent.faecium*)et E2 (*Ent. faecalis*) présentant la plus faible productrice d'EPS de taux de 5 mg/l et 4 mg/l respectivement.

Plusieurs autours comme (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015) révèlent que , le taux de l'EPS produite par LAB est fortement influencé par la culture et les conditions de fermentation telles que le pH, la température et la composition des milieux .

4.4 Aptitudes probiotiques des souches étudiées

4.4.1 Résistance à l'acidité

Ce test est très discriminant pour éliminer les souches les plus fragiles dans la condition acide, pour ce test, les souches ont été immergé dans une solution simulée gastrique à pH 2 et incubées à 42 °C pendant 3 heures (SALVUCCI et al., 2016). Les résultats de la Figure (4.27) présentent l'effet d'un milieu acide à pH 2 sur la viabilité des souches testées .

La croissance des cellules viables est significative ($p < 0.05$) démunie durant 3 heures d'incubation.

La réduction de croissance variée entre 0.63 et 0.82 log CFU/ml pour les souches de type bacilles et 3.73 et 6.25 log CFU/ml pour les souches de type cocci.

Les souches présentant le meilleur taux de survie sont (LB1, LB2, LB3), en effet, après le traitement, ces souches perdent entre 10.14 et 6.43% de viabilité. Parmi ces trois souches, seul souche de LB1 (*Lactobacillus bulgaricus*) présente une forte tolérance au milieu acide à pH 2 de viabilité de plus de 90%.

D'autre souches présentant les moins viabilité sont ST1 (*Streptococcus thermophilus*) et E1 (*Enterococcus faecium*) de taux de 59.6% et 60.5 %,respectivement, après le stress acide . Au contraire, la souche présente la moins résistante et présentant la faible viabilité est E2 (*Enterococcus faecalis*) de taux de 25% .

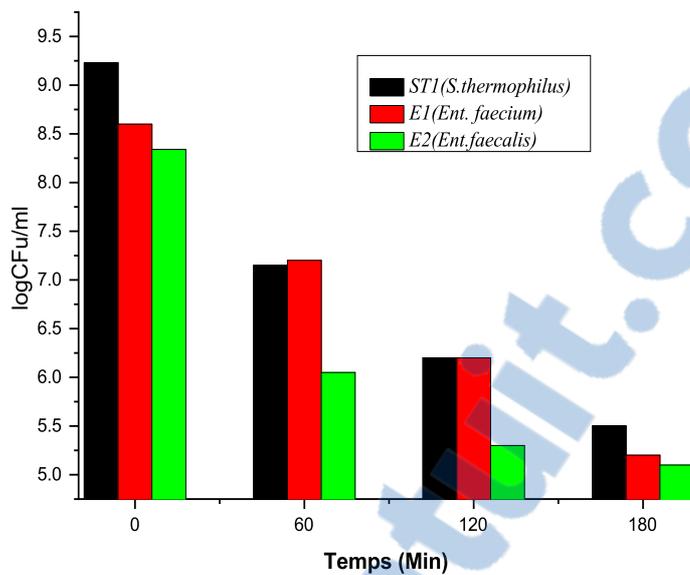


FIGURE 4.27: Effet d'un milieu acide à pH 2 sur la viabilité des souches examinées de (*Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus sp.*).

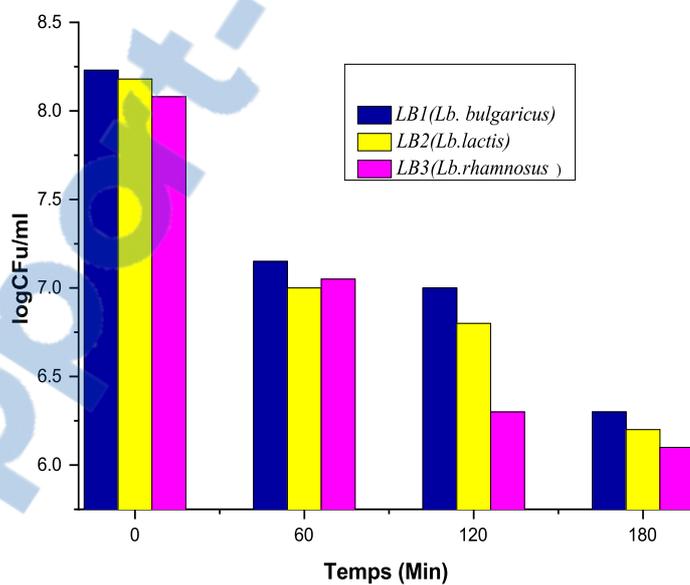


FIGURE 4.28: Effet d'un milieu acide à pH 2 sur la viabilité des souches examinées de (*Lactobacillus sp.*).

4.4.2 Résistance aux sels biliaires

Les résultats de la viabilité des souches examinées après un stress biliaire à 0,3% pendant 3 h sont présentées dans la Figure (4.30). Les souches testées présentent une résistance très différente à l'exposition aux sels biliaires à 0.3 %, Ainsi, les souches LB1 (*Lb. bulgaricus*), LB2 (*Lb. Lactis*) et LB3 (*Lb. rhamnosus*) présentent une très bonne résistance avec une réduction de croissance entre 1.29 et 2.84 log CFU/ml de viabilité supérieur à 60%. Les autres souches testées présentent une moyenne survie après le stress biliaire, en particulier les souches ST1 (*S. thermophilus*) et E1 (*Enterococcus faecium*), par contre, la plus faible résistance est remarquée chez la souche E2 (*Enterococcus faecalis*) de viabilité de 14.82% pendant 180 minutes d'incubation.

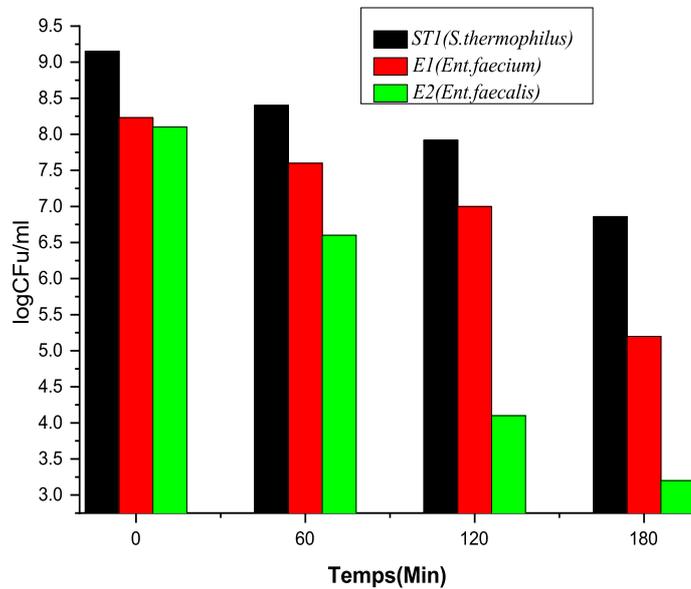


FIGURE 4.29: Effet des sels biliaires à 0.3% sur la viabilité des souches examinées de (*Streptococcus thermophilus*) et (*Enterococcus sp*).

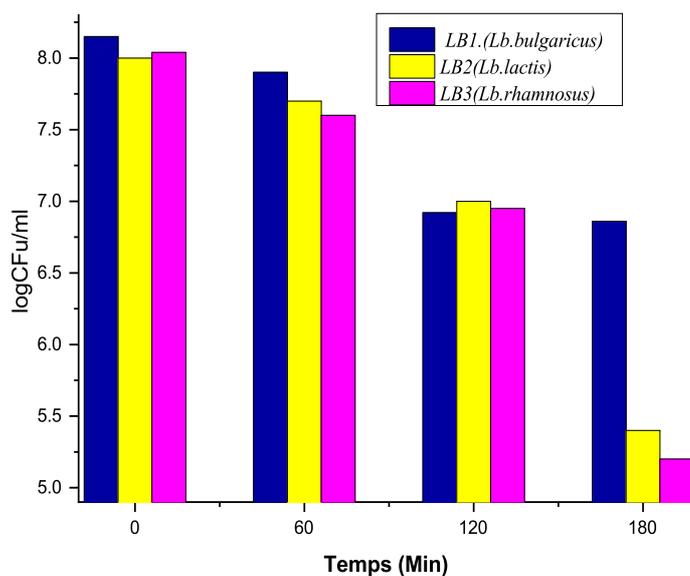


FIGURE 4.30: Effet des sels biliaires à 0.3% sur la viabilité des souches examinées de (*Lactobacillus sp*) .

4.4.3 Résistance à la pepsine

Afin de caractériser et de comparer la résistance au passage du tube digestif, des souches sélectionnées ont été immergées dans une solution de pH 2 avec 3mg/L de pepsine et incubées à 42°C pendant 3 heures (SALVUCCI et al., 2016). Puis, le taux de survie des souches examinées a été mesuré par le comptage des colonies, les résultats sont présentés dans Figure (4.32).

Les résultats obtenus montrent une bonne résistance de la majorité des souches à ce test puisque presque toutes les souches ont un taux de survie supérieur à 60%.

Cependant, seules trois souches présentent un taux de survie supérieur à 80%. Ce sont les souches LB1(*Lb. bulgaricus*), LB2(*Lb. lactis*) et LB3(*Lb. rhamnosus*). Une souche présente une viabilité plus faible; il s'agit de E2(*Enterococcus faecalis*).

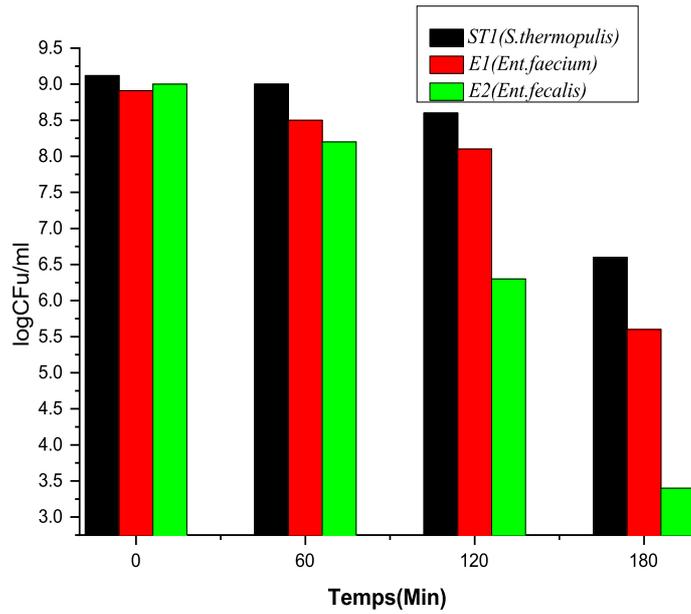


FIGURE 4.31: Effet d'un milieu acide à pH 2 avec la pepsine sur la viabilité des souches examinées de (*Streptococcus thermophilus*) et (*Enterococcus sp*) .

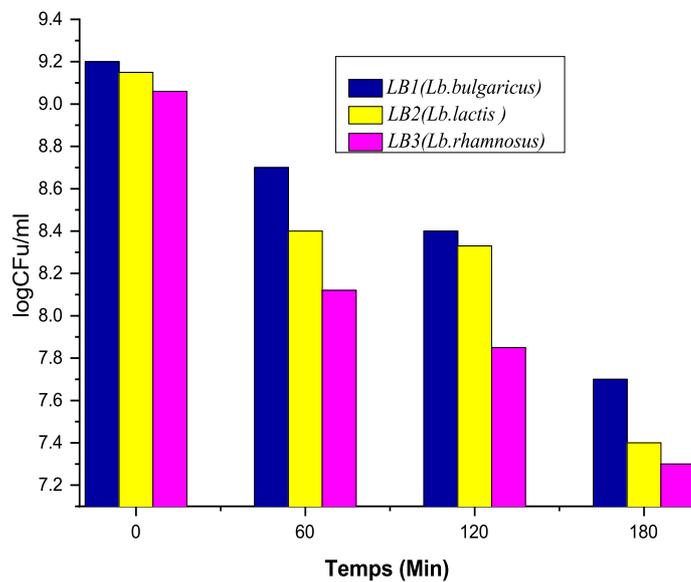


FIGURE 4.32: Effet d'un milieu acide à pH 2 avec la pepsine sur la viabilité des souches examinées de (*Lactobacillus sp*) .

4.4.4 Thermorésistance

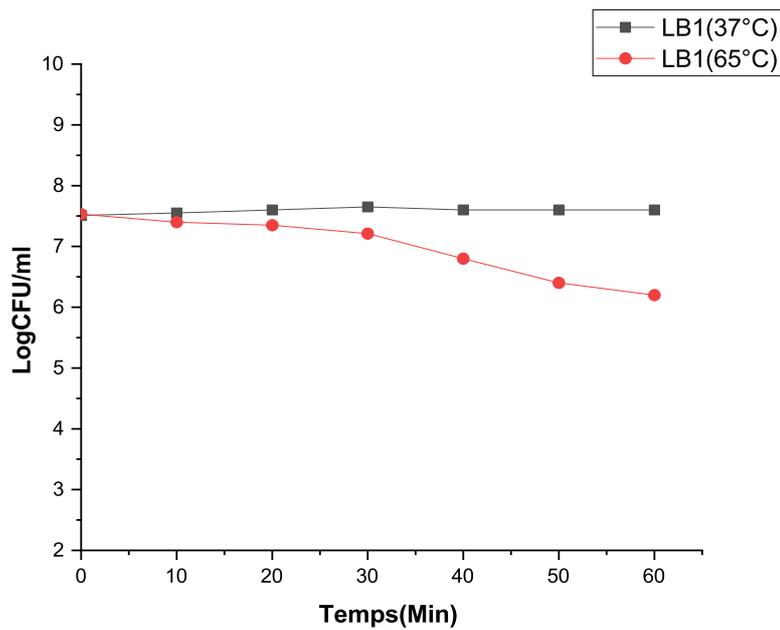
Pour évaluer l'utilisation potentielle de ces souches comme cultures probiotiques, un test préliminaire a été effectué afin d'évaluer leurs survies à la température de 65°C.

Ce test est très intéressant ,exploité dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique lors du passage des produits à la pasteurisation ou la stérilisation .

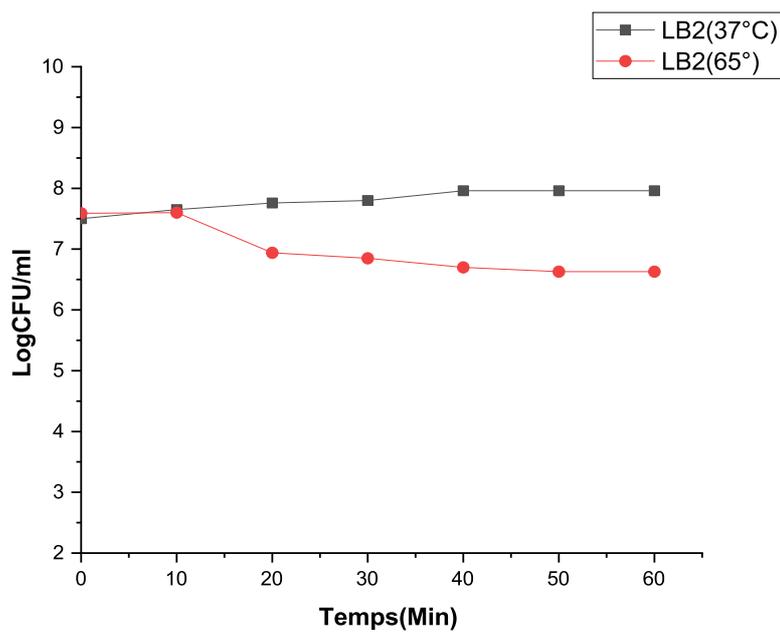
Les résultats des figures (4.33),(4.34),(4.35) présentent l'effet du chauffage à 65°C sur la viabilité des souches probiotiques, ces résultats montrent que les souches ont diminué légèrement leurs nombres de cellule durant l'augmentation du la durée du traitement.

En général la majorité des souches présentent une résistance élevées au stress thermique pendant une heures d'incubation avec une réduction variée entre 0.31 et 1.58l log CFU/ml de taux de viabilité varié entre 91% et 76% , parmi ces souches, la souche ST1(*S.thermophilus*) présente la plus forte résistance à la température de 65°C de viabilité de 91% , d'autre part, la souche E2(*Ent.fecalis*) présente la moins résistante et faible viabilité à 76% seulement.

..

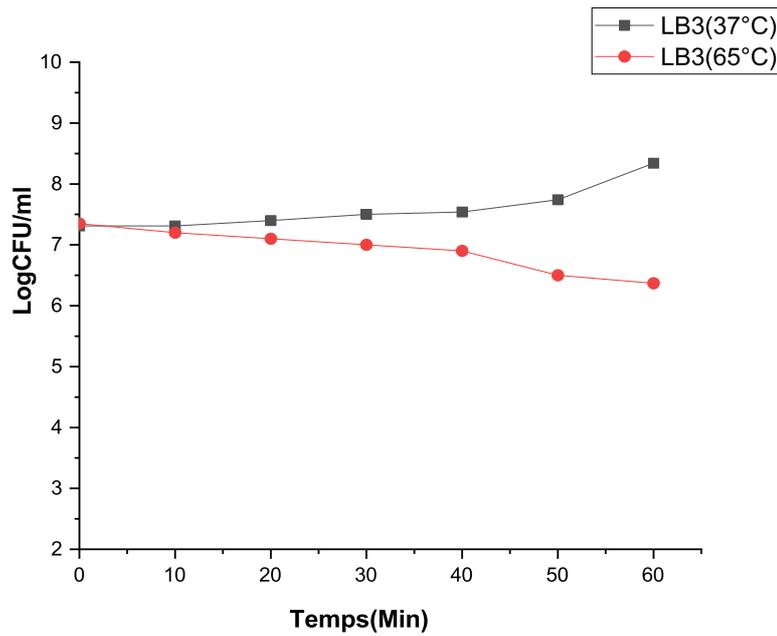


(a)

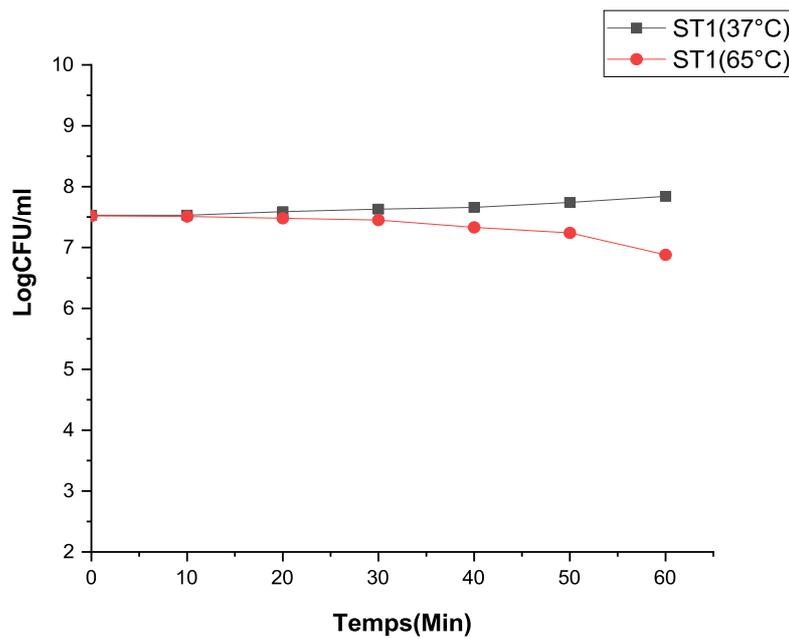


(b)

FIGURE 4.33: Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées (a) LB1(*Lb. bulgaricus*) (b) :LB2(*Lb. lactis*).

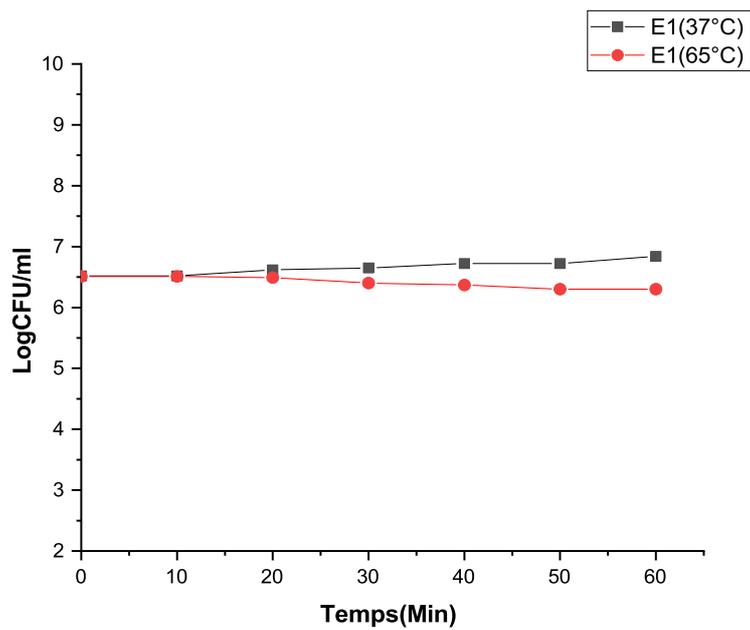


(a)

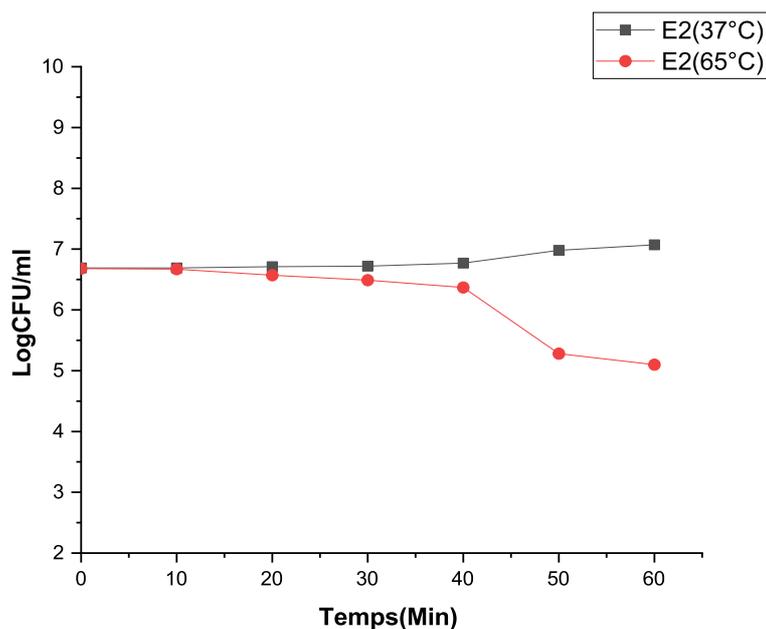


(b)

FIGURE 4.34: Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées (a) LB1(*S.thermophilus*) (b) :LB3(*Lb.rhamnosus*).



(a)



(b)

FIGURE 4.35: Effet d'un chauffage à 65°C sur la viabilité des souches examinées (a) E1(*Ent. faecium*) (b) : E2(*Ent. faecalis*).

4.4.5 Activité hémolytique

Le test d'activité hémolytique est une évaluation probiotique indispensable réalisée sur un gélose au sang permis de tester les caractères de pathogénicité des souches sélectionnées, il s'agit d'enzymes responsable de la lyse des hématies et cela est considérée comme une condition préalable à la sécurité pour la sélection d'un probiotique.

Les résultats obtenus révèlent que toutes les souches examinées sont α hémolytique (ne hémolyse) et présentent aucune risque sur la consommation humaine.

Chapitre **5**

Discussion

5.1 Isolement et identification des isolats

Le lait cru spontanément fermenté représente une grande valeur alimentaire en raison de sa richesse , les protéines , les glucides et les vitamines vers l'homme , l'animale et la bactérie qui lui constituent un milieu favorable de sa croissance et aussi une nouvelle source des bactéries lactiques indigènes ont des potentialité fermentaire , alimentaire et pharmaceutiques (GUETARNI et BENSOLTANE, 2013).

Dans ce contexte notre étude a pour but d'isoler des souches lactiques ayant une potentialité technologique et probiotique afin de les utiliser comme un starter culture dans l'industrie alimentaire.

pour l'isolement des bactéries lactiques, une série décimale a été réalisée à partir des échantillons de lait fermenté de différents types (vache,chèvre,brebis, chamelle) , la dernière dilution a étéensemencée sur la surface LM17 et en profond sur le milieu MRS acétique et incubées à 45°C.

Le dénombrement et l'isolement des *Lactobacilles sp* et *Streptocoques sp* nécessite des conditions et des facteurs indispensables tels que l'anaérobiose qui est assurée par les gas packs et les milieux des culture sélectifs à savoir MRS acidifié et LM17(ABDELMALEK,A , DALI YAHIA,HEYNDRIKX, 2015).

Les résultats de dénombrement des bactéries lactiques de quatre types de lait montrent que les souches présomptifs *Streptococcus sp* varient entre (10^3) et (7.2×10^3) ufc/ml et les souches présomptif *Lacobacillus* entre (39.5×10^3) et (98.2×10^3) ufc/ml.

L'identification des souches isolées est basée dans un premier ton de façon classique en appliquant les caractères morphologies (la morphologie des cellules) , macroscopiques(la morphologie des colonies) et microscopiques (le test à la catalase et la coloration de Gram).

Microscopiquement, la coloration différentielle utilisée est la plus connue c'est celle de Gram qui permet trier les bactéries en deux groupes. nos souches apparait des cellules de coloration violette de forme bacille disposée en chainette c'est le cas de *Lactobacillus sp* et de forme cocci disposées en chainette c'est le cas de *streptocoques sp* no mobiles.

Pour une bonne orientation d'identification le test catalase est nécessaire, qui est une enzyme de respiratoire permet de dégrader l'eau oxygénée par oxygène de l'air (résultat négatif),ce caractère nous a permis d'orienter aux groupes de bactéries lactiques (CHENTOUF et BENMECHERNENE, 2013) .

Les résultats de ces tests préliminaires à savoir le test catalase et l'aspect morphologique ont permis de classer les isolats en deux types, les isolats de type bacille qui poussent au milieu MRS acidifié sont des colonies muqueuses, blanchâtres ,de

forme lenticulaire, et le type cocci poussent au milieu LM17 de forme punctiforme de petite taille, muqueuses .

Ces résultats sont aussi obtenus par (TABAK et DOUKANI KOULA, 2017) qui ont rapporté que la pré-identification de la souche *Streptococcus thermophilus* cultivée sur un milieu M17 solide donne des colonies rondes et des couleurs blanches , et l'étude microscopique d'un frottis fixé et coloré montrent que cette bactéries est de gram positif ,de forme cocci groupés en chaîne et /ou en paire , tandis que la souche *Lactobacillus bulgaricus* ensemencé sur milieu MRS donne des petites colonies identiques de couleur blanche crème de gram positif groupés en paire et en chaînes en la microscopie.

D'autres tests phénotypiques classiques qui permettent de classer nos souches c'est les caractères physiologiques tels que le vois respiratoire, la température de croissance , la croissance en milieu NaCl en différentes concentrations, hydrolyse l'esculine et l'arginine (GUIRAUD, 1998).

La fermentation des carbohydrates peut compléter l'identification en se basant sur le changement de la couleur de milieu qui contient le propre de bromocésol comme indicateur de pH avec vingt et un sucres qui sont utilisés dans ce test.

Les résultats de l'identification physiologiques et biochimiques ont permis de sélectionner 46 souches qui divisent en deux groupes :

Le premier groupe comprise 22 isolats de type cocci , 20 semblent avoir des *Entérocoques* en raison de leurs caractéristiques physiologiques à savoir :

- ⇒ Capables de se croître à 10°C et 45°C.
- ⇒ Capables de pousser en présence de NaCl à 6.5%,4%,2.5%.
- ⇒ De se croître au milieu alcalin à pH 9.6.
- ⇒ Peuvent réduire le lait de sherman à 0.1%.
- ⇒ Capables de Produisent du NH₃ à partir de l'arginine.
- ⇒ Capable d'hydrolyser l'esculine, survivre après leurs exposition à température 60°C pendant 30 Min.

08 isolats entre eux sont capables de fermenter esculine glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, ribose, sucrose, sorbitol, trehalose et variable pour le galactose et incapable de fermenter amygladin, arabinose, cellubiose, fructose, raffinose, rhamnose, xylose et sont caractérisées comme étant *Enterococcus faecalis* .

Les autres 12 sont capables de fermenter du glucose, lactose, galactose, maltose, sucrose, mannose, mannitol, trehalose, cellubiose et non plus de fermenter sorbitol, raffinose, xylose, melibiose, rhamonose et caractérisés comme étant *Enterococcus faecium*.

Les 02 derniers isolats sont incapables de fermenter le maltose, le galactose manni-

tol, trehalose, cellubiose, melebiose, raffinose, xylose sucrose, arabinose, melezitose, rhamnose, mannitol et caractérisés comme étant de *Streptococcus thermophilus*.

Les caractéristiques phénotypiques des espèces de *Streptococcus thermophilus* ont été signalé par nombreuses chercheurs comme (BENNAMA et al., 2012) qui ont considérés que ces tests comme étant des tests clés rapide et facilitent l'identification phénotypique de ce espèce.

En outre, l'identification des espèces *Entérocooccus faecium* et *Entérocooccus fecalis* sont aussi réalisée par (BELDJILALI et KIELDOUN, 2015) qui ont cités que *Enterococcus faecalis* capable d'utiliser le sorbitol et *Enterococcus faecium* ferment lentement le mannitol et l'arabinose.

Deuxième groupe de type bacille comprise 24 isolats , parmi ceux ,06 isolats sont :
⇒ incapables d'hydrolyser l'arginine et esculine, de pousser à 6.5%,4%,2% NaCl.

⇒ capables aussi de fermenter fructose, glucose, lactose et incapable de fermenter l' arabinose, cellubiose, galactose, raffinose, xylose. Alors elles peuvent classer comme étant *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*.

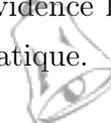
10 isolats sont caractérisés comme *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* en raison de leurs capacité de croissance à 2% NaCl, variable pour l'hydrolyser l'arginine. capables de fermenter le galactose, incapables fermenter l' arabinose, le cellbiose, l'esculine, le mannose, le mellibiose , le xylose.

Les 08 dernières souches sont classées comme *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* au vu de leurs capacité de fermenter un sucre spécial à savoir le rhamnose et incapable de fermenter le melibiose , le raffinose , le xylose, le saccharose et arabinose.

Ces résultats sont semblables avec les résultats de(BELARBI et BENSOLTANE, 2011) qui ont réussi d' isoler 53 souches à partir de différents laits crus (vache , brebis, chèvre) sur les milieu MRS ,M17 , eliker et MSE , elle a réussi à identifier ces souches appartiennent aux quatre genres dont 53 % sont des *Entérocoques*,32 % les *Leuconostocs*, et 12 % sont des *Lactocoques* et 3 % des *Lactobacillues* .

(GUETARNI et BENSOLTANE, 2013) ont aussi pu isolé 37 souches de à partir de trois échantillons de lait cru de chamelle et identifier ces souches en *Lactobacilles* et *Entérocoques* à l'aide des caractéristiques physiologiques et biochimiques, le contrôle technologique montre que ces souches avaient une aptitude qui permet d'utiliser dans l'industrie alimentaire.

pour une identification fiable, l'utilisation des galeries API 50 CHL(biomerieux) et API 20 strep(biomerieux) a été effectuée afin de la mise en évidence les profils de fermentation des hydrates de carbone et aussi l'activité enzymatique.



Ces profils ont été interprétés à l'aide de tableaux et catalogues analytiques ou le logicielle PibWin . Les résultats de cette galeries l'identification a été identique a celle trouves par les méthodes classiques.

Les tests d'identification biochimiques conventionnels sont considérées exacte et standard d'or pour identifier les bactéries isolées. d'autre part, cette méthode est laborieuse en matière de cout et de temps qui nécessite de 10 jours au plus pour obtenir les résultats avec parfois d'erreur d'identification , par contre les systèmes identification commerciaux sont rapide et moins laborieux mais moins précise et leurs performances variable avec l'exactitude limité.

(MOUNA et OUADGHIRI, 2009) ont été identifiées 65 souches par API 50CHL imprécises ou des profils inexistant dans la base de données de API ,ce qui génère des profils inacceptables,dans ce cas on considère les isolats comme non identifiés et étant donné que le système API 50 ne donne pas une identification précise donc , il est indispensable de trouver des méthodes plus fiables et précises .

5.2 Identification génotypique des isolats

Au cours des dernières années l'identification génotypique acquise une grande importance et représente une alternative intéressante aux méthodes d'identification classiques pour révéler le plus précisément possible l'identité de ces bactéries (NIELSEN et al., 2007) .

plusieurs méthodes génotypiques comme le PEG et RAPD-PCR pour la détection efficace d'un microorganisme comportent des principes de base de PCR ,l'hybridation d'ADN , et les puces à l'ADN et biocapteurs , mais malheureusement ces méthodes sont coûteuses et fastidieuses ,donc il serait souhaitable de trouver des méthodes plus précises , peu coûteuses ce qui permet l'identification d'un microorganisme dans un temps plus rapide.

L'identification génotypique des 46 souches isolées a été effectuée par premièrement la technique de rep-PCR qui nécessite l'amorce (GTG5) et permette de clustrer(grouper) les souches aux mêmes groupes en se basant sur les bandes fluorescentes.

Les souches isolées ont été regroupées en huit groupes après la classification hiérarchique de leurs profils rep-PCR .

chaque profil résultait de la combinaison de leurs fragments PCR obtenus avec l'amorce (GTG)5 comprenait des profils rep-PCR homologues entre eux avec de pourcentage de 40%.

24 souches de type bacilles partagent une similitude de plus de 20% avec les profils rep-PCR de trois espèces et sous- espèces à savoir *L. bulgaricus* ,*L. lactis*, *L. rahnmosus*.

Cela suggérerait fortement une appartenance de ces isolats à une de ces espèces,d'autre part deux souches du groupe III avaient des profils proches de *Lactobacilles* de similitude de 18% et ont été identifiées comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

22 souches de type cocci avaient une similitude de 80% avec les profils de trois espèces à savoir *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* , *Streptococcus thermophilus*

ces résultats sont semblable avec les résultats de (BENDIMERAD NACHIDA, 2013) qui a arrivée à identifier par rep-PCR 908 % des isolats qui ont été affiliés à sept espèces et sous-espèces de bactéries lactiques mésophiles appartenant à quatre genres, à savoir : *Enterococcus* (48 isolats : *E. hirae* 21, *E. durans* 13, *E. faecalis* 7, *E. sp.* 7), *Leuconostoc* (15 isolats : *L.mesenteroides*, dont 3 *subsp. dextranicum*, 3 *subsp. mesenteroides* et 9 *susbp. inconnue*), *Lactococcus* (11 isolats : *Lc. lactis subsp. lactis*) et *Lactobacillus* (3 isolats : *Lb. plantarum*).

L'analyse phylogénétique est considérée comme une étape importante et complémentaire à l'identification génétique, le but de cette analyse est de classer les souches lactiques isolées et identifiées préalablement au niveau leur espèce en se basant sur l'évolutive entre les séquences du gène 16S rDNA en conduisant à la construction l'arbre phylogénétique par l'utilisation le logiciel MEGA 7 en particulier l'application Neighbor -joining (TROPICHEVA et al., 2014).

Cette analyse est réalisée par plusieurs autours tels que (ABUSHELAIBI et al., 2017) qui sont classé leurs souches lactiques isolées sur un arbre phylogénique de valeur de bootstrap de 99 % en comparant avec les souches de références.

5.3 Caractérisation technologiques des souches

L'acidification est considérée comme des propriétés métaboliques les plus recherchées en raison de l'intérêt technologiques, cette acidification est due à la production d'acide lactique qui est indispensable dans la conservation de la matière sèche du lait et la coagulation du lait et comme antimicrobienne (SCHMIDT et al., 1994).

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir acidifiant est variable d'une souche à l'autre. En effet, la quantité de lactate produite après 72h d'incubation se situent entre 79°D et 43°D.

Les souches LB1(*Lb.bulgaricus*),LB2(*Lb.lactis*),LB3 (*LB.rhamnosus*) donnent des quantité lactique plus élevé de taux de 79°D 70°D, 69°D respectivement avec une diminution de pH arrive jusqu'à (4.6),(4.5) et (4,4), respectivement après 4 heures, la quantité lactique la plus élevée qui produite a été enregistré chez la souche LB1, par contre la souche ST1 *Streptocoques.thermophilus* donnent un valeur d'acidification moyenne de taux de 49 D° et un pH de 4.4 après de 12 heures d'incubation.

les souches E1 (*Ent.faecium*),E2 (*Ent.faecalis*) donnent des quantité de la acide lactique faible de taux de 40°D, 25°D de pH (5,5) et (5) après 24 heures d'incubation.

Le profil acidifiant de l'ensemble de souche sélectionnées semble avec les travaux de (BELARBI et BENSOLTANE, 2011) qui déclarent aussi que le pouvoir acidifiant des *Entérocoques* réduit le pH de lait à 5 après 24 heures d'incubation .

Nos résultats rejoignent ceux de (CHERIGUENE et al., 2007) qui ont indiqué que les activités acidifiantes des bactéries lactiques varient considérablement d'une souche à l' autre et à l'intérieur d'une même espèce.

Des résultats analogues ont été mentionnés par (CHAMBA et PROST, 1989) qui déclarent que le pouvoir acidifiant de quelques souches de *Lactobacillus* et *Streptococcus thermophilus* diminue en fonction du temps.

(HASSAÏNE et al., 2008) ont mentionné aussi que la diminution du pH au cours du processus de fermentation joue un rôle très important dans les industries alimentaires car, il intervient dans la coagulation du lait en donnant une saveur et arôme très particulier et aussi considéré comme inhibiteur de prolifération des bactéries pathogènes.

Les souches ayant de taux acidification élevée peuvent utiliser comme une culture starter . par contre , les souches ayant de taux d'acidification faible peuvent utiliser mais dans des cultures mixtes en raison de leurs activités protéolytiques élevées dans l'industrie fromagère, la production d'acide lactique et l'abaissement rapide du pH durant la première étape de fabrication du fromage sont très importante . La chute de pH joue un rôle essentiel, d'une part, dans la coagulation du lait en déstabilisant les micelles de caséine, conduisant à la formation du gel, et d'autre part, en donnant à ces produits son goût distinct et caractéristique, contribuant ainsi à leur saveur et arôme (TAMIME et al., 1999).

L'activité protéolytique est un facteur très important dans le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers. La protéolyse pourrait également contribuer à la prévention des allergies fréquentes chez les enfants de moins de 3 ans en raison de la mauvaise digestion des protéines du lait (PESCUMA et al., 2011).

La production de bons produits laitiers de qualité fermentée dépend des propriétés protéolytiques des bactéries de départ, puisque les acides péptidase et les acides formés pendant la fermentation ont un impact direct sur le développement de la saveur, ou servent de précurseurs d'arômes dans les produits laitiers.

D'après Les résultats mentionnés dans le tableau (4.5). on a constaté que toutes les souches testées ont un pouvoir activité protéolytique à l'exception de la souche E2 qui a prouvé le contraire, aussi on a remarqué que cette activité est variable d'une souche à l'autre, A cet égard les souches ont classé en trois catégories.

Classe 1 : regroupe les souches fortement protéolytiques le diamètre de la zone

varient entre 20.2 et 21.34 mm *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. rhamnosus*, ces souches nous ont permis de dégrader rapidement la caséine du lait en acide aminé et considéré la plus performance.

Classe 2 : regroupe la souche moyennement protéolytiques le diamètre à 14 mm, *S. thermophilus*.

Classe 3 : regroupe la souche faible protéolytique de diamètre de 10 mm, *Enterococcus faecium*.

Classe 4 : regroupe la souche non protéolytique de diamètre de 2 mm. *Enterococcus faecalis*.

Ces résultats sont semblables avec d'autres tels que les résultats de (MAGHNIA et BENSOLTANE, 2011).

En peut traduire l'absence de l'activité protéolytique par la perte d'un plasmide codant pour la synthèse de la protéase qui est une enzyme localisée au niveau de la paroi cellulaire et donne à la bactérie la particularité d'hydrolyse des protéines à poids moléculaire élevé qui se trouve dans le milieu de culture tel que la caséine (DESMAZEAUD, 1996), (GASSONAND GOLDE et al., 1985).

(GRIPON et al., 1975) ont prouvé que l'activité protéolytique des bactéries lactiques est assez faible si on la compare à d'autres microorganismes tels que les *Bacillus*, les *Pseudomonas*, les levures et les moisissures

En général, les LAB ont développé un système complexe de peptidase et protéinase et qui leur permet de utiliser la caséine comme un supplément d'azote organique et qui est essentiel pour la croissance optimale dans le lait et contribue de manière significative le développement du saveur dans les produits laitiers fermentés (SMID et al., 1991).

La production d'un produit alimentaire à haute qualité dépend en partie de systèmes protéolytiques des bactéries starters en raison de la peptidase et les acides aminés qui ont fait un impact direct de l'apparition de la saveur dans ces produits transformés.

Suite à l'augmentation de la demande de produits laitiers moins transformés et sans des agents de conservation (ALVAREZ-LEÓN et al., 2006), l'utilisation des bactéries lactiques peut jouer ce rôle pour contrôler les bactéries pathogènes dans certains aliments (GEORGES et al., 2010).

Les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques dépendent plusieurs critères : le pH, le milieu de croissance et la production des substances antibactériennes comme les bactériocines, les acides organiques, les peroxydes hydrogènes (HASSAÏNE et al., 2007).

Afin de rechercher les bactéries lactiques ayant d'effet inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes, des interactions ont été faites entre les 6 souches sélectionnées à partir aux 46 souches isolées et identifiées et 3 bactéries pathogènes *E coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listéria monocytène*, la méthode de diffusion permet d'obtenir une zone claire autour de la bactérie pathogène.

Plusieurs études ont confirmé l'activité antagonisme de bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes à l'exemple de *E. Coli*, *staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* tels que les travaux de (BELARBI et BENSOLTANE, 2011).

D'après nos résultats, les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les souches LB1 (*Lb. bulgaricus*), et ST1 (*S. thermophilus*), ces résultats montrent que les bactéries lactiques ne présentent pas même spectre d'action vis-à-vis les souches pathogènes.

Nos résultats sont semblables aux travaux de (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015) qui sont indiqués que les bactéries de gram négatif sont sensibles au spectre de *Lactobacilles*.

(GOEPFERT et HICKS, 1969) ont prouvé que les bactéries lactiques produisent l'acide lactique et acétique qui inhibent les *staphylococcus aureus* et *salmonella* à pH 5,4 et 4,4 respectivement.

L'antibioresistance c'est un test de prédire la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il sert également l'identification bactérienne par la mise évidence de résistance naturelle, ce test a été signalé par plusieurs auteurs (TABAK et DOUKANI KOULA, 2017).

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les souches testées sont résistants aux majorité des antibiotiques à l'exception de la souche LB1 (*Lactobacilles bulgaricus*) et ST1 (*S.thermophilus*) qui sont sensibles aux pénicilline et vancomycine.

Les souches les plus résistantes aux antibiotiques testés ont été enregistré par les *Entérocoques sp* et confirment les résultats de (BURNICHON et TEXIER, 2003).

(CHERIGUENE et al., 2007) ont révélé que les diamètres des zones d'inhibition différent selon la souche et l'antibiotique utilisé et la grande sensibilité des souches a été remarquée vers la pénicilline. En fait, les bactéries lactiques sont plus sensibles aux antibiotiques de la famille des lactamines (comme la pénicilline) qui représente la famille d'antibiotiques la plus utilisée en pratique clinique (CHOPARD et al., 2001) Plusieurs auteurs comme (MAMI et al., 2008) ont démontré la résistance de *Lactobacilles* aux antibiotiques.

(SHARMA et al., 2014) ont confirmé aussi la résistance de *L. rahmnosus* au antibiotique de Vancomycine.

La production des composés d'arômes est une fonctionnalité technologique impor-

tante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. D'après la figure (4.26), il apparaît que les souches arrivent à produire des arômes (acétoïne) dont l'anneau rouge donc ,elles ont un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.

Nos résultats indiquent que les *Lactobacilles* sont fortes producteurs de diacétyle par rapport d'autre souches testées, cela dépend de l'intensité de la couleur.

(ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015) ont signalé que les 50 souches soumises au ce test prouvés une faible production de diacétyle.

(LEROY et DE VUYST, 2004) ont rapporté dans ces travaux que certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, *Lactococcus lactis* *spb lactis* *biovar diacetylactis* et *Ln mesenteroïdes subsp cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers à savoir diacétyle, acétoïne, 2,3-butanediols et α - acétolactate .

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 diacétyle, d'acétoïne et de CO₂, participant aux qualités aromatiques et texturales des produits (RAYNAUD et al., 2005).

Les polysaccharides sont des polymères largement distribués dans la nature. Leur apparition est bien documentée dans tous les organismes, à savoir. animaux, plantes, champignons et bactéries, Ceux-ci sont adéquatement impliqués dans diverses fonctions biologiques tels que le stockage de l'énergie (amidon), la paroi cellulaire architecture (cellulose) et communication cellulaire (glycosaminoglycanes).

Différents rôles sont attribués à l'EPS bactérienne comme cacher la surface bactérienne, comme des adhésifs pour les interactions avec d'autres surfaces bactériennes ou substrat en tant qu'agents protecteurs environnement et en tant que substances pour l'agrégation bactérienne dans la rhizosphère communautés, comme stabilisateurs de structure dans le biofilm et molécules de signalisation (KUMAR et al., 2007). Les résultats obtenus montrent que la souche la plus forte productrice des exopolysaccharides est enregistrée chez ST1(*Strptococcus Thermophilus*) en comparant avec d'autres souches étudiées.

5.4 Caractérisation probiotiques des souches

L'utilisation des bactéries lactiques à l'effet bénéfique est un intérêt considérable pour la santé et pour les application alimentaire ,la pharmaceutique et alimentation animale(DEVUYST et al., 2004).

Afin de sélectionner les souches à potentielle probiotiques ,il doivent défier le tractus intestinale ,les bactéries sont conforté une forte acidité au niveau de sucs gastriques composées essentiellement par l'acide chlohydrique et la pepsine et aussi un pH comprise entre 1.5 et 5 en cours de l'alimentation ,cette acidité est progressivement lors de passage de duodénum (ABDELMALEK,A , DALI YAHIA,HEYNDRICKX, 2015).

En se sens les souches testées ont présenté une bonne viabilité à faible pH (2) durant 180 minutes d'incubation de taux élevé pour les *Lactobacillus sp* et *Streptococcus thermophilus* et moyenne pour les *Entérocooccus sp* . ces résultats sont semblables avec les résultats du (ABDELMALEK,A , DALI YAHIA,HEYNDRICKX, 2015) qui ont démontré une tolérance élevée chez les souches de *Lactobacillus sp* à faible pH (2) après 2 heures d'incubation .

Les souches testés doivent aussi résister les conditions de stress de l'intestin qui contient la bile, qui est une solution aqueuse jaune verte de fonction de détergent biologique qui empileuse et solubilise les lipides et la dégitions des protéines .

Les résultats obtenus montrent que tous les souches à une forte tolérance au condition de stress (pH 2 avec pepsine 3mg) à l'exception de la souche E2(*Ent.fecalis*) qui présente une viabilité faible durant 3 heures d'incubation , cette durée reflète la moyenne du temps passé par les aliments dans l'estomac .

Une autre propriété importante requise chez les souches probiotiques est la tolérance biliaire afin de confirmer un taux de survie élevé dans l'intestin grêle. Les concentrations d'intestin grêle varient entre 2 et 0,2%, donc une concentration de 0,3% est considéré comme un taux approprié pour la sélection des souches résistantes.

Les résultats des effets de sels biliaires à concentrations de 0,3% sur la capacité de survie des souches testées montrent que les *Lactobacillus sp* présentent une forte résistance contre le stress de sels biliaires à 0.3 % de viabilité de plus de 60% .

Nos résultats sont en accord avec l'une des études de (BOKE et al., 2010) où la tolérance acide à pH 2 des souches de lactiques montre une survie comprise entre 45% et 30%, et une tolérance au sels biliaires à 0,3% de survie de 76%.

Une étude similaire concernant *Enterococcus sp* a été rapportée par (NAMI et al.,

2014a) où la tolérance acide et les sels biliaires d'*Enterococcus faecium* se situaient entre 78% et 48% à PH 3 et entre 88% et 76% à 0,3% et *Entérocooccus faecalis* variant entre 73% et 21% à pH 3 et entre 89% et 31% à concentration de 0,3%, Enfin, ces résultats sont confirmés les résultats de

(CEBECI et al., 2005) qui ont rapporté aussi que les probiotiques no salement capables de transiter au l'estomac et être vivre au l'intestin mais aussi capable de vivre dans des conditions stress.

Le critère de la viabilité à la température élevée (65°C) demeure aussi essentiel de la sélection des souches porbiotiques .Nos souches prouvées la résistance à cette température avec une réduction légère après une heure d'incubation.

Les travaux de (BARBOSA et al., 2014) ont révélé qu'après l'exposition les *Entérocoques* à température de 65°C , il ya une réduction de viabilité entre 1, et 2,7 unité logarithmique , et rapportées qu'une heure d'incubation c'est temps exagéré , car le temps de cuisson généralement est moins .

L'activité hémolytique est une préoccupation majeure pour la sélection de ces souches en tant que cultures starter ou organismes probiotiques.

(FAO, 2002) a signalé que l'absence de l'activité hémolytique est considérée comme une condition préalable de la sécurité pour la sélection d'une souche probiotique.

Les résultats obtenus indiquent que toutes les espèces testées ne sont pas hémolytiques , ces résultats sont semblables aux travaux de (UHLMAN et al., 1992).

(MARAGKOUidakis et al., 2006) ont soumis de 69 souches au test d' hémolytique sur milieu sang humain colombia et prouvé que toutes les souches sont g- (non -hémolyse) sauf quatre souches exposées α hémolytique ceci était *Lb pentosus*. .

Chapitre 6

Conclusion

6.1 Conclusion

Les bactéries lactiques jouent un rôle très importants durant la vie quotidienne de l'homme. Notre travail a permis d'isoler et purifier 46 souches de caractère de bactéries lactiques à partir de 20 échantillons (de lait vache(4), lait chèvre (4), lait de brebis(4), lait de chamelle(4)).

Dans un premier temps nous avons identifié les souches sélectionnées de façon phénotypique en utilisant les méthodes classiques telles que les caractères morphologiques (la forme, la taille) et les caractères physiologiques à savoir la thermo-résistance, la croissance dans le lait de sherman 0/1%et en milieu hyper salé à différente concentration , et les caractères biochimiques comme la fermentation des sucres et les galeries API50 CHL, et API20 strep.

Une identification confirmative de ces souches a été abouties par l'utilisation de méthode de génotypique de PCR 16S rDNA où les résultats de cette méthode ont été compatibles avec l'identification classique précédente.

Nous sommes arrivés à identifier 46 souches jusqu'à au stade d'espèce :

⇒(06) : *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*.

⇒ (08) : *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis*.

⇒ (08) : *Lactobacillus Casei subsp rhamnosus*.

⇒ (02) : *Streptococcus thermophilus*.

⇒ (12) : *Enterococcus faecalis* .

⇒ (08) : *Enterococcus faecium*.

La seconde partie consistait à sélection des souches à caractéristiques d'intérêts technologiques en focalisant sur l'activité acidifiante et protéolytique afin d'évaluer leurs potentiels technologiques pour un éventuel usage industriel.

Il ressort que nos souches (LB1, LB2, LB3, LB4) montrent un niveau acidifiant et protéolytique très élevés accompagnées de taux moyens d'activité acidifiante et protéolytiques chez souche ST1(*s.thermophilus*) .

Au contraire,pour les souches (E1(*Ent faecium*),E2(*Ent faecalis*) qui forment une faible activité acidifiante et protéolytiques .

Il paraît que les souches (LB1, LB2, LB3) s'avèrent présenter un potentiel technologique et très approprié pour l'application industrielle à différentes échelles.

La troisième partie relative au potentiel probiotique par l'exposer les souches sélectionnées au milieu de croissance avec différentes caractéristiques afin de déterminer leurs survies dans des concentrations hostiles qui opposé le long du tractus digestif.

Nos résultats montrent que les souches (LB1, LB2, LB3) ont été trouvées à posséder des bonnes prospérités probiotiques in vitro en raison de leurs résistances au stress acide, et la même fois aux enzymes telles que la pepsine et surtout la défier aux sels biliaires.

Enfin, en perspective en focaliseront sur les applications concernant les souches sélectionnées (LB1, LB2, LB3, ST1) qui ont révélé des potentiels technologiques très intéressants :

- ⇒ En peut utiliser des levains pour fermenter de différents laits.
- ⇒ Des application in vivo sur relative aux souches sélectionnées qui possèdent des aptitudes probiotiques .
- ⇒ Identification et purification les bactériocines des souches sélectionnées probiotiques et étudier leurs propriétés.
- ⇒ Les tests adhésion de ces souches probiotiques dans des études in vitro, et in vivo.

Bibliographie

- ABDELMALEK, A , DALI YAHIA, HEYNDRICKX, Bensoltane (2015). « Determination Of Survival And Resistance To Acidity As Probiotic Potential Of Infant And Calf Faecal Bifidobacteria ». In : *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Ver. II* 10.4, p. 2319-7676.
- ABUSHELAIBI, Aisha, Suheir ALMAHDIN, Khaled EL-TARABILY, Nagendra P SHAH et Mutamed AYYASH (2017). « SC ». In : *LWT - Food Science and Technology*. ISSN : 0023-6438. URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>.
- ADIMPONG, David B, Dennis S NIELSEN, Kim I SØRENSEN, Patrick M F DERKX et Lene JESPERSEN (2012). « Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products ». In : p. 10-12.
- ALAKAR, B M, A J D AS et S C D EKA (2017). « In Vitro Probiotic Potential of Enterococcus Speies Isolated From TUNGRYMBAI , A Fermented Soybean Product of MEGHALAYA , INDIA ». In : 46.3, p. 297-304. DOI : 10.1556/066.2016.0017.
- ALMEIDA JÚNIOR, de, Washington Luiz Gonçalves. da SILVA FERRARI Íris, Jane Viana de SOUZA, Carla Daiane Andrade da SILVA, Mateus Matiuzzi da COSTA et Francesca Silva DIAS (2015). « Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk ». In : *Food control* 53, p. 96-103.
- ALTSCHUL, Stephen F, Thomas L MADDEN, Alejandro A SCHÄFFER, Jinghui ZHANG, Zheng ZHANG, Webb MILLER et David J LIPMAN (1997). « Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs ». In : *Nucleic acids research* 25.17, p. 3389-3402.

- ALVAREZ-LEÓN, Blanca ROMÁN-VINAS Eva-Elisa et Lluís SERRA-MAJEM (2006). « Dairy products and health : a review of the epidemiological evidence ». In : *British Journal of Nutrition* 96.S1, S94-S99.
- AMMOR, Ana Belén FLÓREZ Mohammed Salim et Baltasar MAYO (2007). « Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria ». In : *Food Microbiology* 24.6, p. 559-570.
- ARIHARA, Keizo, Robert G CASSENS et John B LUCHANSKY (1993). « Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes* ». In : *International journal of food microbiology* 19.2, p. 123-134.
- ASHRAF et Rabia. SHAH Nagendra P (2011). « Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yogurtA review ». In : *International journal of food microbiology* 149.3, p. 194-208.
- AYALA-HERNÁNDEZ, I. HASSAN, HD GOFF, R Mira de ORDUÑA et M CORREDIG (2008). « Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins : effect of pH and media composition ». In : *International dairy journal* 18.12, p. 1109-1118.
- BADEL, S. BERNARDI et P MICHAUD (2011). « New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides ». In : *Biotechnology advances* 29.1, p. 54-66.
- BARBOSA, Joana. BORGES Sandra et Paula TEIXEIRA (2014). « Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food ». In : *International journal of food microbiology* 191, p. 144-148.
- BEERENS, Henri, Francois-Marie LUQUET et Rosa María ORIA ALMUDÍ (1990). *Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos/ Guide pratique d'analyse microbiologique des laits des produits laitiers.*
- BEJAR, Wacim, Ameny FARHAT-KHEMAKHEM, Slim SMAOUI, Mohamed MAKNI, Mounira Ben FARHAT, Badis ABDELMALEK, Lotfi MELLOULI, Emmanuelle MAGUIN, Samir BEJAR et Hichem CHOUAYEKH (2011). « Selection of *Lactobacillus plantarum* TN627 as a new probiotic candidate based on in vitro functional properties ». In : *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16.6, p. 1115-1123.

- BELARBI, Fatima et Ahmed BENSOLTANE (2011). « Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens ». Thèse de doct. Université Ahmed Ben Bella d'Oran1 Es Senia.
- BELDJILALI, Wafaa et Afaf KIELDOUN (2015). « Contribution A l'étude de quelques gisements pétroliers Dans le sud-est, algérien. » Thèse de doct.
- BENCHARIF (2001). « Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : état des lieux et problématiques ». In : *Options Méditerranéennes, Ser B* 32, p. 44.
- BENDIMERAD NACHIDA (2013). « Doctorat bendimerad ». Thèse de doct. Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien.U.
- BENNAMA, R. FERNANDEZ Maria, Victor LADERO, Miguel A ALVAREZ, Nadra RECHIDI-SIDHOUM et Ahmed BENSOLTANE (2012). « Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk ». In : *European Food Research and Technology* 234.1, p. 119-125.
- BIZANI, D, APM DOMINGUEZ et A BRANDELLI (2005). « Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A ». In : *Letters in applied microbiology* 41.3, p. 269-273.
- BOKE, Hatice, Belma ASLIM et Gulcin ALP (2010). « The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSs) produced by yogurt starter bacteria ». In : *Archives of Biological Sciences* 62.2, p. 323-328. ISSN : 03544664. DOI : 10.2298/ABS1002323B.
- BORRUEL, Natalia CASELLAS Francesc, Maria ANTOLIN, Marta LLOPIS, Monica CAROL, Eloy ESPIIN, Javier NAVAL, Francisco GUARNER et Juan R MALAGELADA (2003). « Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa ». In : *The American journal of gastroenterology* 98.4, p. 865-870.
- BOUCHER, Yan, Camilla L NESBØ et W Ford DOOLITTLE (2001). « Microbial genomes : dealing with diversity ». In : *Current opinion in microbiology* 4.3, p. 285-289.

- BOUTON, Y, P GUYOT, A DASEN et R GRAPPIN (1993). « Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. I. Validation sur minifromages des techniques de laboratoire ». In : *Le lait* 73.3, p. 265-279.
- BROADBENT, Jeffery R MCMAHON Donald J, DL WELKER, CJ OBERG et S MOINEAU (2003). « Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* : a review ». In : *Journal of dairy science* 86.2, p. 407-423.
- BRÖTZ et Hans-Georg SAHL (2000). « New insights into the mechanism of action of lantibiotics? diverse biological effects by binding to the same molecular target ». In : *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46.1, p. 1-6.
- BURNICHON, Nelly et Anthony TEXIER (2003). « L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques ». In : *DES bactériologie. Semestre été*, p. 1-29.
- BUSSON, C, M CHARPENTIER, M BOUIX, JY LEVEAU et B DUTEURTRE (1996). « Mise au point d'une technique de détection par immunofluorescence des bactéries en vinification ». In : *Oenologie 95 : 5e. Symposium International d'Oenologie*. Technique & Documentation, p. 361-366.
- CAGLAR, B KARGUL et I TANBOGA (2005). « Bacteriotherapy and probiotics role on oral health ». In : *Oral diseases* 11.3, p. 131-137.
- CAO, Yang, A Terrece PEARMAN, Guy A ZIMMERMAN, Thomas M MCINTYRE et Stephen M PRESCOTT (2000). « Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.21, p. 11280-11285.
- CEBECI, Tuncer and Chen Hsun PLATZER Max, Kuo-Cheng CHANG et Jian P SHAO (2005). *Analysis of low-speed unsteady airfoil flows*. Springer Berlin Heidelberg.
- CERNING, Jutta, Christian BOUILLANNE, Michele LANDON et Michel DESMAZEAUD (1992). « Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria ». In : *Journal of Dairy Science* 75.3, p. 692-699.

- CHAMBA, JF et F PROST (1989). « Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite ». In : *Le Lait* 69.5, p. 417-431.
- CHAMPAGNE, Claude P, Francine MONDOU, Yves RAYMOND et Denis ROY (1996). « Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria ». In : *Food Research International* 29.5-6, p. 555-562.
- CHAO, Shiou-Huei, Yasuaki TOMII, Koichi WATANABE et Ying-Chieh TSAI (2008). « Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu ». In : *International journal of food microbiology* 123.1, p. 134-141.
- CHENTOUF, Fatma et Zineb BENMECHERNENE (2013). « Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk ». In : *African Journal of Microbiology Research* 7.23, p. 2961-2969.
- CHERIGUENE, A. CHOUGRANI F, A M A BEKADA, M EL SODA et A BENSOLTANE (2007). « Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats milk ». In : *African Journal of Biotechnology* 6.15.
- CHOPARD, Marie-Amélie. SCHMITT Marc, Eric PERREARD et Jean-François CHAMBA (2001). « Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des lactobacilles thermophiles utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite ». In : *Le Lait* 81.1-2, p. 183-194.
- CHOUGRANI, Fadela, Cheriguene ABDERRAHIM et Bensoltane AHMED (2009). « Physico-chemical and rheological properties of yoghurt manufactured with ewe s milk and skim milk ». In : 8.9, p. 1938-1942.
- CINTAS, LM. CASAUS MP, C HERRANZ, IF NES et PE HERNÁNDEZ (2001). « Review : bacteriocins of lactic acid bacteria ». In : *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* 7.4, p. 281-305.
- CLEVELAND, Jennifer. MONTVILLE Thomas J, Ingolf F NES et Michael L CHIKINDAS (2001). « Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation ». In : *International journal of food microbiology* 71.1, p. 1-20.

- COCOLIN, Luca. DOLCI Paola et Kalliopi RANTSIOU (2008). « Molecular methods for identification of microorganisms in traditional meat products ». In : *Meat biotechnology*. Springer, p. 91-127.
- COLLADO, Luis, Ronald JARA, Néstor VÁSQUEZ et Charles TELSAIN (2014). « Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs ». In : *Food Control* 46, p. 508-512.
- COUDEYRAS, Sophie et Christiane FORESTIER (2010). « Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine ». In : *Canadian Journal of Microbiology* 56.8, p. 611-650.
- CRITTENDEN, Ross. KARPPINEN Sirpa, Suvi OJANEN, Maija TENKANEN, Richard FAGERSTRÖM, Jaana MÄTTÖ, Maria SAARELA, Tiina MATTILA-SANDHOLM et Kaisa POUTANEN (2002). « In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82.8, p. 781-789.
- CUMMINGS, David E. PURNELL Jonathan Q, R Scott FRAYO, Karin SCHMIDOVA, Brent E WISSE et David S WEIGLE (2001). « A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans ». In : *Diabetes* 50.8, p. 1714-1719.
- DE LEBLANC, de Moreno, Alejandra. CASTILLO Natalia A et Gabriela PERDIGON (2010). « Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection ». In : *International journal of food microbiology* 138.3, p. 223-231.
- DE MAN, JC, deM ROGOSA et M Elisabeth SHARPE (1960). « A medium for the cultivation of lactobacilli ». In : *Journal of applied Bacteriology* 23.1, p. 130-135.
- DEGEEST, Bart. VANINGELGEM Frederik et Luc DE VUYST (2001). « Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria ». In : *International Dairy Journal* 11.9, p. 747-757.
- DESMAZEAUD (1996). « Growth inhibitors of lactic acid bacteria ». In : *Dairy Starter Cultures*, p. 151-152.

- DEVRIESE et Bruno POT (1995). « The genus *Enterococcus* ». In : *The genera of lactic acid bacteria*. Springer, p. 327-367.
- DEVUYST, L. AVONTS L et L MAKRAS (2004). « Probiotics, prebiotics and gut health ». In : *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Cambridge, Woodhead Publishing, p. 416-482.
- DONNET-HUGHES, A. ROCHAT F, P SERRANT, JM AESCHLIMANN et EJ SCHIFFRIN (1999). « Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria : effective dose ». In : *Journal of Dairy Science* 82.5, p. 863-869.
- DOSTA, Maria del Carmen Monroy. BARRERA Talia Castro, Francisco José Fernández PERRINO et Lino Mayorga REYES (2009). « Revisión bibliográfica : Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas ». In : *ContactoS* 73, p. 63-72.
- DROSINOS, Eleftherios H. PARAMITHIOTIS Spiros, George KOLOVOS, Ioannis TSIKOURAS et Ioannis METAXOPOULOS (2007). « Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece ». In : *Food Microbiology* 24.3, p. 260-270. ISSN : 07400020. DOI : 10.1016/j.fm.2006.05.001.
- DUBOC et Beat MOLLET (2001). « Applications of exopolysaccharides in the dairy industry ». In : *International Dairy Journal* 11.9, p. 759-768.
- EDDEBBARH (1989). « Systèmes extensifs d'élevage bovin laitier en Méditerranée. Options Méditerranéennes, Série A : Séminaires Méditerranéens n. 6 ». In : *Le lait dans la région méditerranéenne*, p. 123-133.
- EMBALÓ, Deolinda Paulino Camarada (2014). « Estudo da microbiota láctica em leites fermentados artesanalmente consumidos no sul de Angola ». In :
- ENNAHAR, Saïd . SASHIHARA Toshihiro, Kenji SONOMOTO et Ayaaki ISHIZAKI (2000). « Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity ». In : *FEMS microbiology reviews* 24.1, p. 85-106.
- FAO (2002). « WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food ». In : *London, Ontario, Canada* 30.

- FARNWORTH, E R. MAINVILLE I, M-P DESJARDINS, N GARDNER, I FLISS et C CHAMPAGNE (2007). « Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation ». In : *International journal of food microbiology* 116.1, p. 174-181.
- GARABAL, J Ignacio RODRIGUEZ-ALONSO Patricia et Juan A CENTENO (2008). « Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain) ». In : *LWT-Food science and technology* 41.8, p. 1452-1458.
- GARVIE (1984). « 5 Separation of Species of the Genus *Leuconostoc* and Differentiation of the *Leuconostocs* from Other Lactic Acid Bacteria ». In : *Methods in microbiology* 16, p. 147-178.
- GASSONAND GOLDE, David W, Judith C ., Susan E KAUFMAN, Carol A WESTBROOK, Rodney M HEWICK, Randal J KAUFMAN, Gordon G WONG, Patricia A TEMPLE, Ann C LEARY, Eugene L BROWN et al. (1985). « Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity ». In : *Nature* 315.6022, p. 768-771.
- GEORGES, B AAD Abbott, J ABDALLAH, AA ABDELALIM, A ABDESSELAM, O ABDINOV, B ABI, M ABOLINS, H ABRAMOWICZ, H ABREU et al. (2010). « The ATLAS simulation infrastructure ». In : *The European Physical Journal C* 70.3, p. 823-874.
- GHAZIFATIMA (2014). « Thèse de Doctorat Identification des bactéries lactiques par l' utilisation des techniques moléculaires (profils protéiques et génétiques) applicables dans le domaine de la taxonomie . » Thèse de doct. université d'oran Ahmed Benbella 1, p. 2013-2014.
- GHOSH, Moumita. TUCKER Dawn E, Scott A BURCHETT et Christina C LESLIE (2006). « Properties of the Group IV phospholipase A 2 family ». In : *Progress in lipid research* 45.6, p. 487-510.
- GOEPFERT et RUTHANN HICKS (1969). « Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. » In : *Journal of bacteriology* 97.2, p. 956.
- GRANATO, Dominique. BERGONZELLI Gabriela E, Raymond David PRIDMORE, Laure MARVIN, Martine ROUVET et Irène E CORTHÉSY-THEULAZ (2004). « Cell

- surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins ». In : *Infection and immunity* 72.4, p. 2160-2169.
- GRIPON, JC. DESMAZEAUD MJ, D LE BARS et JL BERGERE (1975). « Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II.-Influence de la présure commerciale ». In : *Le lait* 55.548, p. 502-516.
- GUETARNI, Hassina et Ahmed BENSOLTANE (2013). « Isolation and characterization of helicobacter pylori strains from gastric biopsies of Algerian patients ». In : *OnLine Journal of Biological Sciences* 13.2, p. 41-49.
- GUEVARA et JORGE (2011). « Probióticos en nutrición animal ». In : *Sistema de revisiones en investigación veterinaria en San Marcos*.
- GUIRAUD, JP (1998). « Microbiologie alimentaire, microbiologie des principaux produits laitiers ». In : *Edition DUNOD, Paris* 65.
- HAMILTON-MILLER (2003). « The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection ». In : *International journal of antimicrobial agents* 22.4, p. 360-366.
- HARDIE (1986). *Oral streptococci. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol 2, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG*.
- HASSAÏNE, O. ZADI-KARAM H et N E KARAM (2007). « Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) ». In : *African Journal of Biotechnology* 6.14, p. 1720-1727. ISSN : 1684-5315.
- HASSAÏNE, O ZADI-KARAM H et NE KARAM (2008). « Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw milks in south Algeria ». In : *Emir. J. Food Agric* 20.1, p. 46-59.
- HAWTIN, P R. STACEY A R et D G NEWELL (1990). « Investigation of the structure and localizatiion of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies ». In : *Microbiology* 136.10, p. 1995-2000.

- HOLZAPFEL, R GEISEN et U SCHILLINGER (1995). « Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes ». In : *International journal of food microbiology* 24.3, p. 343-362.
- ISHIBASHI et Shoji YAMAZAKI (2001). « Probiotics and safety ». In : *The American journal of clinical nutrition* 73.2, 465s-470s.
- ISHIKAWA, Hiroki, Etsuko KUTSUKAKE, Toshie FUKUI, Toshiaki SHIRAI, Tatsuya KURIHARA, Nobuhiko OKADA, Hirofumi DANBARA, TOBA MASAMICHI, Noriyuki KOHDA, Yasuyuki MAEDA et OTHERS (2010). « Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain b240 protected mice against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ». In : *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74.7, p. 1338-1342.
- IVANOVA AND MITEVA V, I ., T S STEFANOVA, A PANTEV, I BUDAKOV, S DANOVA, P MONCHEVA, I NIKOLOVA, X DOUSSET et P BOYAVAL (1998). « Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81 ». In : *International journal of food microbiology* 42.3, p. 147-158.
- JEAN-CLAUDE et OTHERS (1985). « Composition du lait de vache I. Lait de grand m{é}lange ». In : *Cah Nutr Diet* 20, p. 283-291.
- JIE, Li. AROUTCHEVA Alla A, Sebastian FARO et Michael L CHIKINDAS (2005). « Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus* ». In : *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 13.3, p. 135-140.
- JIMÉNEZ-PEARSON, María-Antonieta. DELANY Isabel, Vincenzo SCARLATO et Dagmar BEIER (2005). « Phosphate flow in the chemotactic response system of *Helicobacter pylori* ». In : *Microbiology* 151.10, p. 3299-3311.
- JORDAN, E. EGAN J, C DULLEA, J WARD, K MCGILLICUDDY, G MURRAY, A MURPHY, B BRADSHAW, N LEONARD, P RAFTER et OTHERS (2006). « *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004 ». In : *International journal of food microbiology* 112.1, p. 66-70.
- JUAN et ANTONIO (2013). « Identificación de bacterias ácido Lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación ». In :

- KALLIOMÄKI, Marko. SALMINEN Seppo, Heikki ARVILOMMI, Pentti KERO, Pertti KOSKINEN et Erika ISOLAURI (2001). « Probiotics in primary prevention of atopic disease : a randomised placebo-controlled trial ». In : *The Lancet* 357.9262, p. 1076-1079.
- KALMOKOFF, ML. DALEY E, JW AUSTIN et JM FARBER (1999). « Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria* ». In : *International Journal of Food Microbiology* 50.3, p. 191-201.
- KANDLER, O et N WEISS (1986). « Microbiology of mesu a traditional fermented bamboo shoot product ». In : *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins*, p. 1209-34.
- KAWAI, Yasushi. KEMPERMAN Rober, Jan KOK et Tadao SAITO (2004). « The circular bacteriocins gassericin A and circularin A ». In : *Current Protein and Peptide Science* 5.5, p. 393-398.
- KEMPERMAN, Robèr. KUIPERS Anneke, Harma KARSENS, Arjen NAUTA, Oscar KUIPERS et Jan KOK (2003). « Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574 ». In : *Applied and environmental microbiology* 69.3, p. 1589-1597.
- KETHIREDDIPALLI, Prashanti. HILL Arthur R et Douglas G DALGLEISH (2010). « Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation ». In : *International Dairy Journal* 20.12, p. 838-843.
- KLAENHAMMER (1993). « Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria ». In : *FEMS microbiology reviews* 12.1-3, p. 39-85.
- KODAMA, Masaaki, Kazunari MURAKAMI, Tadayoshi OKIMOTO, Takashi ABE, Yoshifumi NAKAGAWA, Kazuhiro MIZUKAMI, Masahiro UCHIDA, Kunimitsu INOUE et Toshio FUJIOKA (2012). « *Helicobacter pylori* eradication improves gastric atrophy and intestinal metaplasia in long-term observation ». In : *Digestion* 85.2, p. 126-130.
- KOÏCHE, Malika (2011). « Effet des bactéries lactiques locales du yaourt sur l'intolérance au lactose ». Thèse de doct.

- KRIEG, NR et JG HOLT (1984). « Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology.-vol. 1 ». In : *William and Wilkins, Baltimore, London*.
- KUMAR, Suresh, Anita. MODY Kalpana et Bhavanath JHA (2007). « Bacterial exopolysaccharides perception ». In : *Journal of basic microbiology* 47.2, p. 103-117.
- LAWS, Andrew, Yucheng GU et Valerie MARSHALL (2001). « Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria ». In : *Biotechnology advances* 19.8, p. 597-625.
- LEE, WJ et JA LUCEY (2010). « Formation and physical properties of yogurt ». In : *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23.9, p. 1127-1136.
- LEROY, Frédéric et Luc DE VUYST (2004). « Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry ». In : *Trends in Food Science & Technology* 15.2, p. 67-78.
- LI, Xin. BEESON William T, Christopher M PHILLIPS, Michael A MARLETTA et Jamie HD CATE (2012). « Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases ». In : *Structure* 20.6, p. 1051-1061.
- LIN, Wen-Hsin. LIN Chien-Ku, Sen-Je SHEU, Chin-Fa HWANG, Wan-Ting YE, Wen-Zhe HWANG et Hau-Yang TSEN (2009). « Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells ». In : *Journal of food science* 74.6.
- LIPUMA, JJ. RICHMAN H et TL STULL (1990). « Haemocin, the bacteriocin produced by *Haemophilus influenzae* : species distribution and role in colonization. » In : *Infection and immunity* 58.6, p. 1600-1605.
- LJUNGH et Torkel WADSTROM (2006). « Lactic acid bacteria as probiotics ». In : *Current issues in intestinal microbiology* 7.2, p. 73-90.
- LOOIJESTEIJN, Petronella J TRAPET Lionel, Eric de VRIES, Tjakko ABEE et Jeroen HUGENHOLTZ (2001). « Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* ». In : *International journal of food microbiology* 64.1, p. 71-80.

- LOUMANI Akil, Belarbi Fatima et Ahmed BENSOLTANE (2016). « Enumeration, Isolation and Identification Phenotypic Thermophile Lactic Acid Bacteria Isolated From Different Fermented Milk Collected in Algeria ». In : *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)* 5.5, p. 53-62.
- LOURENS-HATTINGH et Bennie C VILJOEN (2001). « Yogurt as probiotic carrier food ». In : *International dairy journal* 11.1, p. 1-17.
- LUCEY, JA, M TAMEHANA, H SINGH et PA MUNRO (1998). « A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or gluconolactone ». In : *Food Research International* 31.2, p. 147-155.
- MAGHNIA, djamila et Ahmed BENSOLTANE (2011). « Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens ». Thèse de doct. Université Ahmed Ben Bella d'Oran Es Senia.
- MAMI, Anas, Henni Jamal EDDINE, Kihal MEBROUK et OTHERS (2008). « Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goats milk against Staphylococcus aureus ». In : *World J Dairy Food Sci* 3.2, p. 39-49.
- MARAGKOUidakis, Petros A. ZOUMPOPOULOU Georgia, Christos MIARIS, George KALANTZOPOULOS, Bruno POT et Effie TSAKALIDOU (2006). « Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products ». In : *International Dairy Journal* 16.3, p. 189-199.
- MARSHALL et HL RAWSON (1999). « Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt ». In : *International journal of food science & technology* 34.2, p. 137-143.
- MARTEAU, M MINEKUS, Pm. HAVENAAR R, JHJ HUIS et al. (1997). « Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine : validation and the effects of bile ». In : *Journal of dairy science* 80.6, p. 1031-1037.
- MARTÍN-PLATERO, Antonio M, Eva VALDIVIA, Mercedes MAQUEDA et Manuel MARTÍNEZ-BUENO (2009). « Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses ». In : *International journal of food microbiology* 132.1, p. 24-32.

- MATYAR, Aysenur KAYA et Sadık DINÇER (2008). « Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey ». In : *Science of the Total Environment* 407.1, p. 279-285.
- MCLEOD, Anette. NYQUIST O Ludvig, Lars SNIPEN, Kristine NATERSTAD et Lars AXELSSON (2008). « Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods ». In : *Systematic and Applied Microbiology* 31.5, p. 393-403.
- MEDOUAKH, A AIT ABDESLAM et A BENSOLTANE (2010). *Antagonistic Activity of Lactobacillus Sp. Against Helicobacter pylori*.
- MENAD, N.and Loumani Akil BENSOLTANE Ahmed, Djamila MAGHNIA, Nachida SLIMANE, Fadela CHOUGRANI et Abderrahim CHERIGUENE (2012). « Antimicrobial Activity of Probiotics on Swiss Mice ». In : 2, p. 382-387.
- MERIBAI, A. DIAFET A, A BACHENE, A BAHLOUL, M OUARKOUB et S NAAMI (2016). « Acetaldehyde and lactate production after long term freezing for three thermophilic wild streptococcus thermophilus strains : evaluation in single culture Evaluation des potentialites enzymatiques d ' aromatisation et d ' acidification des souches lactiques autochtones : Streptococcus Thermophilus , en culture pure , apres une longue duree de cryoconservation ». In : 32.4, p. 1871-1878.
- MEULEN, der, Roel. GROSU-TUDOR Silvia, Fernanda MOZZI, Frederik VANINGELGEM, Medana ZAMFIR, Graciela Font de VALDEZ et Luc DE VUYST (2007). « Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved ». In : *International journal of food microbiology* 118.3, p. 250-258.
- MITCHELL, Mark A et Simon M SHANE (2001). « Salmonella in reptiles ». In : *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. T. 10. 1. Elsevier, p. 25-35.
- MOLL, Gert N. KONINGS Wil N et Arnold JM DRIESSEN (1999). « Bacteriocins : mechanism of membrane insertion and pore formation ». In : *Lactic acid bacteria : Genetics, metabolism and applications*. Springer, p. 185-198.
- MONTEALEGRE, M CAMILA, O. JARAMILLO Carlos Alberto, Gustavo MONTEALEGRE, Giovanna PARRA, P DELGADO, M del PILAR et al. (2010). « Detección

- histológica y molecular de *Helicobacter pylori* y genotipificación con base en los genes de virulencia *babA2* e *iceA* en pacientes con patología gástrica benigna ». In : *Revista chilena de infectología* 27.2, p. 112-118.
- MOUNA et Mme OUADGHIRI (2009). « Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés Â« Lben Â» et Â« Jben Â» d ' origine marocaine Dédicaces ». Thèse de doct.
- MOZZI, Fernanda. VANINGELGEM Frederik, Elvira María HÉBERT, Roel Van der MEULEN, María Remedios Foulquié MORENO, Graciela Font de VALDEZ et Luc DE VUYST (2006). « Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers ». In : *Applied and environmental microbiology* 72.6, p. 4431-4435.
- NAGHMOUCHI, Karim. KHEADR Ehab, Christophe LACROIX et Ismaïl FLISS (2007). « Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes* ». In : *Food microbiology* 24.7, p. 718-727.
- NAMI, Y, N ABDULLAH, B HAGSHENAS, D RADIAH, R ROSLI et A YARI KHOSROUSHAHI (2014a). « A newly isolated probiotic *Enterococcus faecalis* strain from vagina microbiota enhances apoptosis of human cancer cells ». In : *Journal of applied microbiology* 117.2, p. 498-508.
- NAMI, Yousef, Norhafizah ABDULLAH, Babak HAGSHENAS, Dayang RADIAH, Rozita ROSLI et Ahmad Yari KHOSROUSHAHI (2014b). « Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora ». In : *Journal of medical microbiology* 63.8, p. 1044-1051.
- NEDJRAOUI, D (2001). *Algérie. Document de profil fourrager*.
- NES, Ingolf F et Helge HOLO (2000). « Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria ». In : *Peptide Science* 55.1, p. 50-61.
- NIELSEN, Dennis Sandris. TENIOLA O D, L BAN-KOFFI, M OWUSU, T S ANDERSON et W H HOLZAPFEL (2007). « The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods ». In : *International journal of food microbiology* 114.2, p. 168-186.

- ORTEGA, E. ANAMI M et G DINIZ (2002). « Certification of food products using emergy analysis ». In : *Proceedings of III International Workshop Advances in Energy Studies*, p. 227-237.
- ORTIZ-PRINCZ, Diana, Verónica GUARIGLIA-OROPEZA, Maira ÁVILA, Mariana CORRENTI, Marianella PERRONE, Beatriz GUTIERREZ, Javier TORRES, Francis MEGRAUD et Mariana Eugenia CAVAZZA (2010). « Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes in Cuban and Venezuelan populations ». In : *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105.3, p. 331-335.
- OUWEHAND, Arthur C. SALMINEN Seppo et Erika ISOLAURI (2002). « Probiotics : an overview of beneficial effects ». In : *Lactic Acid Bacteria : Genetics, Metabolism and Applications*. Springer, p. 279-289.
- PAPAGIANNI et Sofia ANASTASIADOU (2009). « Pediocins : The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications ». In : *Microbial Cell Factories* 8.1, p. 3.
- PATEL, Seema. MAJUMDER Avishek et Arun GOYAL (2012). « Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria ». In : *Indian journal of microbiology* 52.1, p. 3-12.
- PERDIGON, G. GALDEANO C Maldonado, JC VALDEZ et M MEDICI (2002). « Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system ». In : *European journal of clinical nutrition* 56.n4s, S21.
- PEREIRA, Dora IA et Glenn R GIBSON (2002). « Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans ». In : *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 37.4, p. 259-281.
- PESCUMA, Micaela. HÉBERT Elvira María, Hanitra RABESONA, Martine DROUET, Yvan CHOISSET, Thomas HAERTLÉ, Fernanda MOZZI, Graciela Font VALDEZ et Jean-Marc CHOBERT (2011). « Proteolytic action of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin ». In : *Food chemistry* 127.2, p. 487-492.
- POT, Bruno et Effie TSAKALIDOU (2009). « Taxonomy and metabolism of Lactobacillus ». In : *Lactobacillus molecular biology : From genomics to probiotics* 1, p. 1-56.

- POT, Caroline, Hulin JIN, Amit AWASTHI, Sue Min LIU, Chen-Yen LAI, Rajat MADAN, Arlene H SHARPE, Christopher L KARP, Shi-Chuen MIAW, I-Cheng HO et al. (2009). « Cutting edge : IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells ». In : *The Journal of Immunology*, jimmunol-0901233.
- QUINTERO, M A PIZARRO, Enrique. RODRIGO Luis, Josep M PIQUÉ, Angel LANAS, Julio PONCE, Gonzalo MIÑO, Javier GISBERT, Aurora JURADO, Ma HERRERO et OTHERS (2005). « Association of Helicobacter pylori-related Distal Gastric Cancer with the HLA Class II Gene DQB1* 0602 and cagA+ Strains in a Southern European Population ». In : *Helicobacter* 10.1, p. 12-21.
- RAYNAUD, Sandy. PERRIN Rémi, Muriel COCAIGN-BOUSQUET et Pascal LOUBIERE (2005). « Metabolic and transcriptomic adaptation of Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk ». In : *Applied and environmental microbiology* 71.12, p. 8016-8023.
- ROISSART, de et F M LUQUET (1994). « Bact{é}ries Lactiques—Aspects fondamentaux et technologiques ». In : *Bact{é}ries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques* 1.
- RUAS-MADIEDO, Patricia. HUGENHOLTZ Jeroen et Pieternela ZOON (2002). « An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria ». In : *International Dairy Journal* 12.2, p. 163-171.
- RUAS-MADIEDO, Patricia. SALAZAR Nuria et G CLARA (2009). « Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides ». In : *Bacterial polysaccharides : current innovations and future trends*, p. 279.
- RUAS-MADIEDO, Patricia, Borja SÁNCHEZ, Claudio HIDALGO-CANTABRANA, Abelardo MARGOLLES et Andrew LAWS (2012). « Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria ». In : *Handbook of Animal Based Fermented Food and Beverage Technology*, p. 125-151.
- SAHRAOUI, Naima. DOTREPPE Olivier, Mohamed Brahim ERRAHMANI, Saliha BOUDJENAH, Babelhadj BAAISSA, Djamel GUETARNI et Jean-Luc HORNICK (2014).

- « Caractérisation des acides gras de la viande cameline en Algérie ». In : *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 49.5, p. 231-234. ISSN : 00079960.
- SALAZAR, Nuria. RUAS-MADIEDO Patricia, Sofia KOLIDA, Michelle COLLINS, Robert RASTALL, Glenn GIBSON et G CLARA (2009). « Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures ». In : *International journal of food microbiology* 135.3, p. 260-267.
- SALMINEN, Seppo et Atte VON WRIGHT (2004). *Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects*. T. 139. CRC Press.
- SALMINEN, Seppo, AC OUWEHAND et E ISOLAURI (1998). « Clinical applications of probiotic bacteria ». In : *International Dairy Journal* 8.5-6, p. 563-572.
- SALVUCCI, Emiliano, Jean Guy LEBLANC et Gabriela PEREZ (2016). « Technological properties of Lactic Acid Bacteria isolated from raw cereal material ». In : *LWT - Food Science and Technology*. ISSN : 0023-6438. DOI : 10.1016/j.lwt.2016.02.043. URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.043>.
- SANDERS et Mary ELLEN (2000). « Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health ». In : *The Journal of nutrition* 130.2, 384S-390S.
- SANDERS, Mary Ellen. HUIS Jos et al. (1999). « Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory and labeling issues ». In : *Lactic Acid Bacteria : Genetics, Metabolism and Applications*. Springer, p. 293-315.
- SANDINE, William E. ELLIKER Paul R et OTHERS (1970). « Microbially induced flavours and fermented foods. Flavour in fermented dairy products. » In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18.4, p. 557-562.
- SARANTINOPOULOS, Christian ANDRIGHETTO, PANAGIOTIS., Marina D GEORGI-LAKI, Mary C REA, Angiolella LOMBARDI, Timothy M COGAN, George KALANTZOPOULOS et Effie TSAKALIDOU (2001). « Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance ». In : *International Dairy Journal* 11.8, p. 621-647.

- SARKAR, PK et JP TAMANG (1994). « The influence of process variables and inoculum composition on the sensory quality of kinema ». In : *Food microbiology* 11.4, p. 317-326.
- SARMIENTO, Augusto (2008). « Functional bracing of fractures of the shaft of the humerus ». In : *Orthopedic Trauma Directions* 6.01, p. 33-37.
- SAVADOGO, ALY et Alfred S TRAORE (2011). « La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés ». In : *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5.5, p. 2057-2075.
- SCHMIDT, JL. TOURNEUR C et J LENOIR (1994). « Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologie laitière ». In : de Roissart, H. Luquet, FM (Eds). *Bactéries lactiques* 2, p. 37-54.
- SETTANNI, LUCA et Aldo CORSETTI (2008). « Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation ». In : *International journal of food microbiology* 121.2, p. 123-138.
- SHARMA, Poonam, Sudhir Kumar TOMAR, Pawas GOSWAMI, Vikas SANGWAN et Rameshwar SINGH (2014). « Antibiotic resistance among commercially available probiotics ». In : *Food Research International* 57, p. 176-195.
- SHEU, J-J WU, B-S. LO C-Y, H-W WU, J-H CHEN, Y-S LIN et M-D LIN (2002). « Impact of supplement with Lactobacillus-and Bifidobacterium-containing yogurt on triple therapy for Helicobacter pylori eradication ». In : *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16.9, p. 1669-1675.
- SKOURI, M (1993). « La désertification dans le bassin Méditerranéen : Etat actuel et tendance ». In : *Etat de l'Agriculture en Méditerranée. Les sols dans la région méditerranéenne : utilisation, gestion et perspectives d'évolution. Cahiers Options Méditerranéennes* 1.2, p. 23-37.
- SMID, Eddy J. POOLMAN Bert et Wil N KONINGS (1991). « Casein utilization by lactococci. » In : *Applied and environmental microbiology* 57.9, p. 2447.
- SODINI, Isabelle. REMEUF Florent, Samia HADDAD et Georges CORRIEU (2004). « The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture : a review ». In : *Critical reviews in food science and nutrition* 44.2, p. 113-137.

- SOUKOULIS, C. PANAGIOTIDIS P, R KOURELI et C TZIA (2007). « Industrial yogurt manufacture : monitoring of fermentation process and improvement of final product quality ». In : *Journal of dairy science* 90.6, p. 2641-2654.
- STANTON, C. DESMOND C, G FITZGERALD et RP ROSS (2003). « Probiotic health benefits-reality or myth? » In : *Australian journal of dairy technology* 58.2, p. 107.
- STOTT, Matthew B et Michael W TAYLOR (2016). « Microbial ecology research in New Zealand ». In : *New Zealand Journal of Ecology* 40.1, p. 1.
- STUHLMACHER, Alice F, Treena L GILLESPIE et Matthew V CHAMPAGNE (1998). « The impact of time pressure in negotiation : A meta-analysis ». In : *International Journal of Conflict Management* 9.2, p. 97-116.
- SUTHERLAND, Ian W (2001). « Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework ». In : *Microbiology* 147.1, p. 3-9.
- TABAK et BENSOLATANE (2015). « TABAK Souhila ». Thèse de doct. Université d'Oran.
- TABAK et and Bensolatane Ahmed DOUKANI KOULA (2017). « Anti-Helicobacter Pylori Activity of Three Medicinal Plants (Cinnamomum zeylanicum, Syzygium aromaticum and Zingiber officinale) ». In : *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)* 6.2, p. 61-70.
- TAGG, John R. DAJANI Adnan S et Lewis W WANNAMAKER (1976). « Bacteriocins of gram-positive bacteria. » In : *Bacteriological reviews* 40.3, p. 722.
- TAJKARIMI, M M. IBRAHIM, Salam A et D O CLIVER (2010). « Antimicrobial herb and spice compounds in food ». In : *Food control* 21.9, p. 1199-1218.
- TAMIME, Adnan Y et Richard Kenneth ROBINSON (1999). *Yoghurt : science and technology*. Woodhead Publishing.
- TAMIME, Adnan Y et Richard Kenneth ROBINSON (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt : science and technology*. Elsevier.

- TAMIME, Adnan Y, Valerie M E MARSHALL et Richard K ROBINSON (1995). « Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria ». In : *Journal of Dairy Research* 62.01, p. 151-187.
- TERZAGHI, Betty E et WE SANDINE (1975). « Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages ». In : *Applied microbiology* 29.6, p. 807-813.
- THORBURN, Christine M . FRIEDMAN Gary D, Chris J DICKINSON, Joseph H VOGELMAN, Norman ORENTREICH et Julie PARSONNET (1998). « Gastrin and colorectal cancer : a prospective study ». In : *Gastroenterology* 115.2, p. 275-280.
- TIWARI et Sheela SRIVASTAVA (2008). « Purification and characterization of plantaricin LR14 : a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14 ». In : *Applied microbiology and biotechnology* 79.5, p. 759-767.
- TJAKKO, Abee. KROCKEL Lothar et Colin HILL (1995). « Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning ». In : *International journal of food microbiology* 28.2, p. 169-185.
- TODOROV, van Reenen, Svetoslav. CAROL ANN, DIMITRO. et Leon Milner Theodore DICKS (2004). « Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer ». In : *Journal of General and Applied Microbiology* 50.3, p. 149-157.
- TRACHOO, N. FRANK J F et N J STERN (2002). « Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses ». In : *Journal of food protection* 65.7, p. 1110-1116.
- TROPICHEVA, Rositsa, Dilyana NIKOLOVA, Yana EVSTATIEVA et Svetla DANOVA (2014). « Anaerobe Antifungal activity and identification of *Lactobacilli* , isolated from traditional dairy product katak ». In : *Anaerobe* June, p. 1-7. ISSN : 1075-9964. URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.010>.
- TUOHY, K M. KOLIDA S, A M LUSTENBERGER et Glenn R GIBSON (2001). « The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructooligosaccharides—a human volunteer study ». In : *British Journal of Nutrition* 86.03, p. 341-348.

- UHLMAN, JR SCHILLINGER U .and Rupnow et WH HOLZAPFEL (1992). « Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables ». In : *International Journal of Food Microbiology* 16.2, p. 141-151.
- USHIYAMA, K M. TANAKA Kazuo, Yuji AIBA, Tadahiko SHIBA, Atsushi TAKAGI, Tetsuya MINE et Yasuhiro KOGA (2003). « *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection ». In : *Journal of gastroenterology and hepatology* 18.8, p. 986-991.
- VANDAMME, Peter. FALSEN E, R ROSSAU, Bart HOSTE, Paul SEGERS, R TYTGAT et Jozef DE LEY (1991). « Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy : emendation of generic descriptions and proposal of *Arco bacter* gen. nov. » In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41.1, p. 88-103.
- WALTERS, Nancy. TRUNKLE Theresa, Michael SURA et David W PASCUAL (2005). « Enhanced immunoglobulin A response and protection against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the absence of the substance P receptor ». In : *Infection and immunity* 73.1, p. 317-324.
- WHITE, Charles H, Arun KILARA, YH HUI et Ramesh C CHANDAN (2008). *Manufacturing yogurt and fermented milks*. John Wiley & Sons.
- YAVUZDURMAZ et HATICE (2007). « Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk ». Mém. de mast. İzmir Institute of Technology.
- YU, Wen Ru. LIU Tianyi, Tara K FEHLINGS et Michael G FEHLINGS (2009). « Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury ». In : *European Journal of Neuroscience* 29.1, p. 114-131.
- ZARAI, Faouzi. SMAOUI Ikram, Jean-Marie BONNIN et Lotfi KAMOUN (2010). « Seamless mobility in heterogeneous wireless networks ». In : *International Journal of Next-Generation Networks* 2.4.

Chapitre **7**

Annexe

7.1 Milieux de culture

Les milieux de culture.

1-Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

(*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus sp.* et *Leuconostoc sp.*)

Milieu de base.

Peptone tryptique de caséine 2,50g

Peptone pepsique de viande 2,50g

Peptone papainique de soja 5,00g

Extrait de levure 2,50g

Extrait de viande 5,00g

β disodium glycérophosphate 19,00g

Sulfate de magnésium (MgSO₄) 0,25g

Acide ascorbique 0,50g

Agar-agar 18,00g

Eau distillée (qsp) 950,00ml

pH=7,2

Répartir à raison de 95 ml par fiole de 125 ml.

Stérilisation à l'autoclave : 120 C° pendant 20 minutes.

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

(*Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.* et *Pediococcus sp.*)

Extrait de levure 4,00 g

Extrait de viande 8,00 g

Peptone 10,00 g

Acétate de sodium 5,00 g

Citrate d'ammonium 2,00 g

Glucose 20,00 g

Phosphate dipotassique (K₂HPO₄) 2,00 g

Sulfate de magnésium (MgSO₄) 0,25 g

Sulfate de manganèse (MnSO₄) 0,05vg

Tween 80 1,00 ml

Agar-agar 18,00 g

Eau distillée (qsp) 1000,00 ml

pH=6,8

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes.

3-Milieu Bouillon nutritif (BN) .

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

4-Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941).

Infusion de viande de bouf 300cm³

Peptone de caséine 17.5 g

Amidon de maïs 1.5 g

Agar-agar 17 g

pH 7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20 min Eau

5- Milieux de PCR product.

Insatagen Matrix 200 μ l

PCR Mastermix 13 μ l

PCR Mastermix 13 μ l

Primer (GTG5, 5 μ M) 5 μ l

Sterile MilliQ-water 4 μ l

DNA 3 μ l

5-Préparation du gel d'agarose 1.5 %.

Trisbase 108 g

boric acid 1, 55 g

EDTA 0.5 M

pH 8.

10 μ l d'échantillon

charger 3 μ l of de marker

electrophoresis (120 V, 5 h).

6-MRS bouillon sans extrait de viande

MRS bouillon sans extrait de viande 1000 ml

Pourpre de Bromocrésol 0.025 mg

pH 7 Autoclavage

7-NaOH à N/9 .

Hydroxyde de sodium 4, 445 g

Eau distillée 1000 ml

La préparation de cette solution doit être effectuée avec une grande précision.

7-Phénolphtaléine à 1%.

Phénolphtaléine 1 g

Ethanol à 95% 100 ml

8-Solution de lactose

Lactose 10,00 g

Eau distillée (qsp) 100,00 ml

9-Milieu complet

Milieu de base préalablement fondu et ramené à 48-50°C 95,00 ml Solution de lactose chauffée à 48 C° 5,00 ml Mélanger par agitation.

Pour les lactococccques le milieu M17 additionné de (0,5%, p/v) de glucose (GM17).

10-Milieu Möller à l'arginine

Peptone pepsique de viande 5,00 g

Extrait de viande 5,00g

Pourpre de bromocrésol 0,01 g

Rouge de crésol 0,005 g

Glucose 0,50 g

Pyridoxal 0,005 g

Arginine 10,00 g

Eau distillée 1000,00 ml

pH=6,8

Stérilisation à l'autoclave : 120 C° pendant 15 minutes.

11-Lait écrémé (milieu de conservation)

Lait en poudre 12.5 g

Eau distillée 100 ml.

Glycérol 15 ml

12-Eau physiologie

Utilisée pou la préparation des dilutions Chlorure de sodium 9g

Eau distillée 1000 ml.

Autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

13-le milieu de l'e'esculine

peptone 5g.

esculine 0.5g.

citrate de fer 0.5g.

Agar-Agar18g.

REP PCR CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM SHEEP'S MILK IN ALGERIA AND ASSESSMENT OF THEIR PROBIOTICS POTENTIAL

*LOUMANI AKIL AND BENSOLTANE AHMED

Laboratory of Food and Industrial Microbiology, University of Ahmed Benbella, Oran 1, Algeria

(Received 31 December, 2017; accepted 1 March, 2018)

Key words : Rep PCR, 16S DNA gene, Lactic acid bacteria, Potentials probiotics

Abstract - Lactic acid bacteria (LAB) found in many environments ranging from fermented foods to the mammalian gastrointestinal tract. The aim of the present study was to isolate and identify coccoid lactic acid bacteria from raw sheep's milk using a combination of pheno-and genotypic methods, including (GTG) 5-based rep-PCR fingerprinting, 16Sr RNA gene sequencing and carbohydrate assimilation profiling. Further, basic traits for potential probiotics screening such as tolerance of acidity and 0.3% concentration of bile salts, antimicrobial susceptibility antibacterial activity, and hemolysis was assessed. Using molecular biology-based methods and selected phenotypic tests such as catalase reaction, CO₂ production from glucose, colonies, and cells morphology and fermented particular sugars, the twenty two isolates were identified as *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus thermophilus*. The selected isolates were grown in acidity at pH 2 and survival in bile salts of 0.3% concentration and were resistance to some antibiotics such as chloramphenicol, vancomycin, tetracycline, gentamicin, penicillin G, and sensible to another. They inhibited several pathogenic bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and no hemolytic activity was observed.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) are grouped in the gastrointestinal tract of humans and in a variety of farm animals as well as several different food sources, such as meats, milk, and cheeses. They are utilized in foods and fermented food as a starter culture (Pieniz *et al.*, 2013). Various studies recognized the *Enterococcus* sp and *Streptococcus thermophilus* as probiotics. A probiotics are live-organisms Common or single which beneficially influence the health of humans or animals by enhancing the properties of the indigenous gastrointestinal flora and also of their ability to inhibit of the food-borne pathogen (Argyri *et al.*, 2013). Several studies revealed that the most probiotic cultures belong to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, while some *Enterococcus* has also been successfully used as human probiotics (Rehaïem *et al.*, 2014b). Moreover, they improve microbial the balance of intestinal and alleviate symptoms of

inflammatory diseases, or irritable bowel syndrome, and treatment of hypertension and diabetes (Weichselbaum, 2010). Several distinguishes of the LAB which considered as probiotics such as tolerance to acid and bile conditions, antimicrobial properties nonhemolytic etc.

Sheep's milk constitutes a reservoir important of the LAB, in particular, the genus *Enterococcus* which can be used with high potential probiotics (Martins *et al.*, 2014). On the other hand, Numerous techniques genotypic identification of strains have been used in order to classify these strains, but they are very laborious, however, The rep-PCR fingerprinting (GTG)5 and 16 rRNA sequencing based two primers were easy to distinguish and grouping of strains and also fast identification (Pavel, 2005). The objective of this study was to isolate and identify the lactic bacteria species based pheno-genotypic method, using biochemical tests and rep-PCR fingerprinting (GTG)5 primer, 16 rRNA gene sequencing, and further to evaluate

their potential probiotics of through, tolerance of acidity, survival of bile salts antimicrobial activity, Antibiotic susceptibility and hemolytic activity.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Bacterial Strains

Twenty two of isolates cocci belonging to the lactic acid bacteria were isolated from sheep's milk samples, to isolate LAB cocci, Ten (10mL) of each sample were transferred and homogenized with 90 mL of saline water (0,1%) in order to make an initial dilution (10^{-1}). The suspension was used for making suitable serial dilution up to (10^{-8}) by incorporating 1 mL in 9 mL of sterile saline water in sterile tubes. The diluted samples were plated in M17 (Terzaghi and Sandine, 1975) and were incubated at 42 °C for 24-48 h. The isolates growths were checked for purity by streak plating onto the respective media. For long-term storage, isolates were kept at -20 °C in M17 (Oxoid) broths containing 15% (v/v) glycerol for further studies. Working cultures were also kept in M17 agar slant at 4 °C, renewed every 4 weeks (Hassaine *et al.*, 2008).

Biochemical Identification

The strains Gram-positive, catalase-negative were considered as presumptive lactic acid bacteria. These 12 isolates were further characterized by producing gas from glucose, growth at different temperature (10,15, and 45 °C) and pH 9, 6 as well as the ability to grow in different concentration of NaCl such as (2%, 4% and 6.5%.w/v) and sherman test and survival after heating at 60 °C for 30 min (Samelis *et al.*, 1994), hydrolysis of Arginine and Esculine (Mead and Thomas, 1973) and production of acetone from glucose, determined by using the Voges-Prokauer test. These isolates were also characterized by the ability to ferment the flowing carbohydrates Cellobiose, Galactose, Mannitol, Melezitose, Melibiose, Ribose, Trehalose, Xylose, glucose, Lactose, Saccharose, Fructose and Arabinose (Schillinger and Lücke, 1987).

DNA Extraction for PCR and sequencing Reactions

Overnight-culture of each strain were grown at 42 °C in M17. Cells from cultures were harvested by centrifugation (12,000 rpm, 1 min). Genomic DNA was extracted using the Instagene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories, USA and following the

manufacturer's instructions. DNA extractions were stored at -20 °C.

Rep PCR amplification

Genomic DNA of isolates was analyzed with the rep-PCR fingerprinting method using the GTG5 primer (Table1). With the protocol of (Gevers *et al.*, 2001); (Nielsen *et al.*, 2007), rep PCR reactions were carried out a final volume of 25 μ L containing 13 μ L of aTop Taq Master Mix, 5 μ L primer (GTG5), 3 μ L DNA, and 4 μ L Sterile MilliQ-water. The PCR reaction was used the following thermo cycling program: 5 min at 95 °C, 60 sec, and 8 min at 65 °C and 16 min at 65 °C for 30 cycles. Thereafter, Cooled at 4 °C for 24 hours. The PCR products were separated by electrophoresis; gels were stained with ethidium bromide, photo- graphed under UV illumination and documented using an Al pha Imager gel imaging system (Alpha Innotech, San Francisco, CA, USA). The PCR profiles were normalized and cluster analysis was performed using Bionumerics 4.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, rBelgium). The dendrograms were calculated on the basis of the Dice's Coefficient of similarity using the unweighted pair group method with arithmetic averages clustering algorithm (UPGMA).

16S rDNA sequencing

The isolates representative of each group were selected for sequencing of the 16S rRNA gene, using the universal Primer mix (27f+1540r) (Table 1) (Nielsen *et al.*, 2007), according to manufacturer's instruction a volume recationel composed 3 μ L of DNA, 18 μ L of aTopTaq Master Mix and 16 μ L of Sterile MilliQ-water was amplified with following thermo cycling program: 95 °C for 5 min; 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 120 s; and 72 °C for 10 min with 2- 4 step for 35 cycle. Sequencing was performed in both directions with the universal primers 27F and 785F. and 907R (Table 1). Subsequently, the corrected sequences using the Chromas version 2.33 (Technelysium Pvt. Ltd) and CLC genomic were aligned to 16S rRNA gene sequences in the Gen Bank Database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997).

Probiotic attributes

The Probiotic potential of the LAB was studied by evaluating various factors viz., Acid tolerance, bile tolerance, antibiotic sensitivity, antimicrobial activity and hemolytic activity.

Acid tolerance

The tolerance of the lactic acid bacteria to simulated gastric juices was tested (Gotcheva *et al.*, 2002). The isolate was grown on MRS broth and incubated for 24 h at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10 min at 4 °C, washed twice in sterile phosphate buffer saline PBS, the cells were resuspended in PBS by lowering pH to 2 followed by incubation at 37 °C in each set of pH for 0,60,90,180 min. The total viable count was determined before and after incubation period at pH 2, under aerobic conditions. Control samples without acidification were also prepared. The percent survival of cells was calculated using the formula as given below:

$$\% \text{ Survival} = (\log \text{ cfu}_{3\text{rdh}} / \log \text{ cfu}_{0\text{th h}}) \times 100.$$

Bile tolerance

The resistance of the strains to bile was performed according to (Handa and Sharma, 2016), lactic acid bacteria, cells were inoculated into sterilized 10 mL of MRS broth containing 0.3%, of bovine bile and incubated at 37 °C for 72 h, the survival rate was also calculated using the formula precedent.

Antimicrobial activity

Four indicator microorganisms used in order to evaluate the inhibitory effect antimicrobial of our strains were *Listeria monocytogenes* (ATCC 7659), *Escherichia coli* (ATCC 25955), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 7659). These indicator microorganisms were suspended in tryptone sel water in order to standardize an approximately to 10⁸ CFU/mL, equivalent of 0.5 Mc Farland turbidity. A suspension of each strain tested was applied on the sterile paper disc (5 mm) onto PCA agar plates previously inoculated with a swab. Soaked in a culture of each indicator bacteria. The plates were incubated in 37 °C for 24 h, the zone inhibition was assessed by measuring of bacterial growth around the discs (radius-mm) and considered as positive who above 2 mm. The experiment was performed in triplicate (Barbosa *et al.*, 2014a).

Antibiotic susceptibility

The antibiotic susceptibility was reported as described by (de Almeida Júnior *et al.*, 2015). Six antibiotics were used, namely: chloramphenicol (30 mg/disc), oxacillin (1 mg/disc), vancomycin (30 mg/disc), tetracycline (30 mg/disc), ciprofloxacin (5 mg/

disc) and penicillin G (UI/disc). The strains were suspended in 4 mL sterile Distillate water in order to achieve 0,5 McFarland turbidity standard, then the inoculum was spread onto the Muller Hinton agar then, the antibiotics disks were applied to the plates. After incubation for 24 h at 37 °C, the results were assessed by measuring of the zone of inhibition of bacteria.

Hemolytic activity

The bacteria were tested for haemolysis Colombia Agar with sheep blood (Oxoid) by streaking 24 hr cultures on the blood agar plates followed by incubation at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerogen, Oxoid) for 24 hrs.

The test strains were examined on Colombia blood agar after incubating in M17 broth at 37°C for 15 h. The hemolytic reaction was evaluated by observing both the partial hydrolysis of red blood cells and the Production of a green zone (α -hemolysis), as well as the total hydrolysis of red blood cells producing a clear zone around bacterial colony (β -hemolysis) or no reaction (γ -hemolysis) (Adimpong *et al.*, 2012).

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed with SPSS (version 6.303). One-way analysis of variance was used to study the means \pm standard deviations (SD) and statistically significant at $p = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic and genotypic characterization

A total of 22 isolates were identified as belonging to three species of lactic acid bacteria isolated from sheep milk samples. 12 were *Enterococcus faecium*, 08 were *Enterococcus faecalis* and 02 were *Streptococcus thermophilus*. We confirmed their identities based on phenotypic-genotypic identification using rep-PCR (GTG) 5 finger printing; cluster analysis showed they were represented in three groups (Fig. 1). Representative isolates from each group were selected for sequencing of the 16 S rRNA genes. High similarities (99-100 %) between the isolates obtained during the present study and sequences deposited in Genbank were found, as shown below. The strains were classified according to their rep-PCR profiles into 3 groups at a similar level of 79%. Group VI clustered strains of the type *Enterococcus*

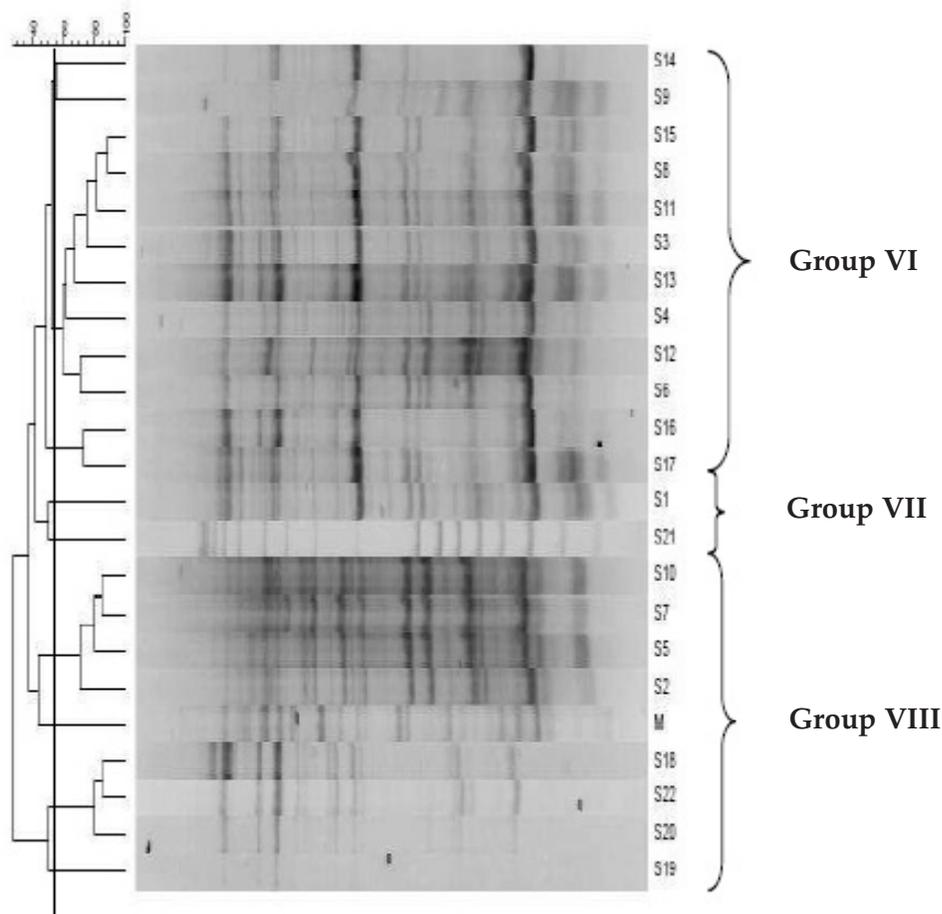


Fig. 1 Dendrogram obtained by cluster analysis of (GTG) 5-based rep-PCR fingerprints of 22 LAB. The dendrogram is based on Dice's coefficient of similarity with the unweighted pair group method with arithmetic average clustering algorithm (UPGMA).

faecium at 82% similarity. Group VII clustered strains of the type *Enterococcus faecalis* at 80% similarity. Group VIII clustered strains of the type *Streptococcus thermophilus* at 79% similarity. The 12 isolates identified as *Enterococcus faecium* grew at 45 °C and did not hydrolyze Arginine and Esculin and most fermented fructose, glucose, Mannitol and the 08 isolates identified as *Enterococcus faecalis* grew at 45 °C and did not hydrolyze Arginine and did not ferment Amygladin Arabinose, cellobiose. The 02 isolates of *Streptococcus thermophilus* able to hydrolyze, esculin and starch and fermented Galactose and Maltose. The characteristics of phenotypic tests proved the evidence metabolic capabilities, but on the other hand gives lack of reproducibility and discriminatory power (Mohammed *et al.*, 2009), Although (GTG) rep-PCR fingerprinting has proven to be a useful tool for differentiating LAB at species, subspecies and up to

strain level (Van Hoorde *et al.*, 2008). Consequently, identification and characterization of lactic acid bacteria depend on the phenotypic identification and need also to use genotypic characterization, rep-PCR, for example, to provide and improve the phenotypic characterization

Assessment probiotics

Three strains ST1 (*Streptococcus thermophilus*), E1 (*Enterococcus faecium*), E2 (*Enterococcus faecalis*) selected from each group, identified previously were screened for probiotic attributes and chosen as probiotics candidate, in order to confirm the fulfilling significant role in improving the microbial balance of gut.

Acid tolerance

Table 2 presents results of acid tolerance of 3 strains at pH 2. The growth of isolated was variable

Table 1. The universal primers used

Name	Sequences (5' to 3')	Size of PCR product (bp)	Reference
GTG5	5'-GTG GTG GTG GTG GTG-GTG3'	1500	DNA Technology A/S, Denmark
27f	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1500	DNA Technology A/S, Denmark
1540r	5- TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'	1500	DNA Technology A/S, Denmark
785F	5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3'	1500	(Macrogen Inc., Korea).
907R	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3	1500	(Macrogen Inc., Korea).
	DNA Technology A/S,Denmark		

Table 2. Potential of for acid tolerance at pH 2.0

Isolated codes	Cell survival (Log cfu/mL) *				%Cell survival (Log cfu/mL) **			
	Time of exposure (h)							
	0	60	120	180	Mean	60	120	180
ST1	9.23	7.15	6.20	5.50	7.02	77.46	67.17	56.33
E1	8.60	7.20	6.20	5.20	6.80	83.57	72.09	60.46
E2	8.34	6.05	5.30	5.10	5.44	72.54	63.54	25.17

* Log cfu/mL: mean of results from three separate experiments.

** % survivability = (log cfu 3rd h/log cfu 0th h) X 100.

decreased with one strain to the other ($p < 0.05$) during 3 hours under the acid condition pH 2. The Strains ST1 showed a survival of 56.33% at 180 min, for strains E2 showed a survival of 60.46% at 180 min, but the E2, showed a survival of 25.17% only.

Bile salts Tolerance

Table 3 showed the effect of bile salts on the growth of strain tested. The three strains exhibited a varying degrees the high tolerance to bile salt at 0.3%. The strain ST1 showed high the viability of 74.97% at 180 min, on the other hand, the strains E1, showed a medium the viability of 63.18% and E2 showed weak viability of 14.18% respectively at 180 min.

Our results were in accordance with one of the studies of (Boke *et al.*, 2010) where shown acid tolerance at pH 2 strains of *Streptococcus thermophilus* with survival between 45% and 30%, and bile salt tolerance at 0.3 % showed the survival of 76%. A similar study concerning *Enterococcus* sp was reported by (Nami *et al.*, 2017) where shown acid tolerance and bile salts of *Enterococcus faecium* ranging between 78 % and 48% at pH 3 and between 88% and 76% at 0.3% and for *Enterococcus faecalis* ranging between 73% and 21% at pH 3 and between 89% and 31% at 0.3% concentration. Several factors determining the survival of these bacteria include particular characteristics of the strains (e.g., acid and bile tolerance, and resistance to gastric and

intestinal juice) (Pieniz *et al.*, 2014). Results of this study showed that strains were able to survive simulated gastric juice at pH 2 after 3 h of incubation. Resistance to bile salts is a prerequisite for colonization and metabolic action of bacteria in the small intestine of the host (Hoier, 1992).

Antibiotic susceptibility and antibacterial activity

Important steps toward to evaluation probiotics proprieties are the antibiotic susceptibility and antibacterial activity. Table 2 shows the results of three strains ST1 , E1, E2 selected which exhibit antimicrobial activity against different indicator microorganisms, including *Listeria monocytogenes* (ATCC 7659), *Escherichia coli* (ATCC 25955), *Staphylococcus aureus* (ATCC 765), and against 6 antibiotic resistance. The isolates exhibited an inhibitory effect against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *E. coli* and prevented their growth with a variable diameter ranging between 4.2 and 2.1, expect E2 (*Enterococcus faecalis*). The inhibition of pathogen growth suggests that the strains tested isolates may have potential application in food preservation as the adjunct culture. This antibacterial activity related to some compound such as acid organic and bacteriocins produced from Our strains during growth (Chang *et al.*, 2009). Our results were in agreement with other works (Barbosa *et al.*, 2014). Also, several studies proved

Table 3. Potential of for bile tolerance with 0.3%.

Isolated codes	Cell survival (Log cfu/mL) *				%Cell survival (Log cfu/mL) **			
	Time of exposure (h)							
	0	60	120	180	Mean	60	120	180
ST1	9.15	8.40	7.92	6.86	7.45	96.93	84.90	74.97
E1	8.23	7.60	7.00	5.20	7.04	97.12	87.50	63.18
E2	8.10	6.60	4.10	1.20	6.94	81.48	50.61	14.18

* Log cfu/mL: mean of results from three separate experiments.

** % survivability = (log cfu 3rd h/log cfu 0th h) X 100.

Table 4. Antimicrobial activity against 3 pathogens and antibiotic resistant toward 6 different antibiotics

Tested strains	Tests of susceptibility				Tests of antimicrobial activity				
	RI	CT	CIP	TE	P	V	L.m	S.a	E.c
ST1	9	1	10	00	22	21	4.1±0.1	3.8±0.1	4.2±0.2
E1	11	12	5	00	00	2	2.2±0.3	2.3±0.3	2±0.0700
E2	15	3	3	15	00	00	00	00	00

S =20mm. 15mm>I<20mm. R =15mm. RI : Rifampine . CT : Clolistine .

CIP : Ciprofloxacin. TE : Tetracycline P : peniciline G. V :vancomycine

that the strains belonging to lactic acid bacteria such as *Enterococcus sp* which display many biotechnological properties such as proteolytic, lipolytic, esterolytic and other enzymatic activities, citrate utilization, and bacteriocin production (Rehaïem *et al.*, 2014a).

The results of antibiotic activity revealed that the strains tested were resistance towards to the majority of antibiotics tested. This resistance due to the absence to the target of the site of that antibiotic in strains cell, thus, the antibiotic susceptibility profile of lactic acid bacteria is in agreement with previous reports concerning *Enterococci* strains that are commonly found in foods and have safety criteria.

Another important assessment criterion is the hemolytic activity which is considered a safety of selection probiotic strains (Adimpong *et al.*, 2012) this investigation was carried in this study and indicated that all strains tested didn't exhibit any effect (γ -hemolysis) in blood agar. Haemolysin plays an important role in enterococcal virulence, as it may increase the chance of the infection (Banwo *et al.*, 2012). Our results were in agreement with those reported by (Adimpong *et al.*, 2012).

CONCLUSION

A total of 22 isolates LAB from raw sheep's milk was

characterized by phenotypic and genotypic techniques. The molecular techniques used in this study have proved successful in the identifications of the strains to species; other hand the strain selected showed the high capacity of upper gastro intestinal transit tolerance and bile salts and Antibiotic susceptibility and antibacterial activity which may be used as an alternative bacterium for future probiotic development

REFERENCES

- Adimpong, D.B., Nielsen, D.S., Sørensen, K.I., Derkx, P.M.F. and Jespersen, L. 2012. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous. *African Fermented Food Products* 10–12.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*. 33 (2): 282–291.
- Banwo, K., Sanni, A. and Tan, H. 2013. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*. 114 (1) : 229–241.
- Barbosa, J., Borges, S. and Teixeira, P. 2014. International Journal of Food Microbiology Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 191: 144–148.

- Boke, H., Aslim, B. and Alp, G. 2010. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSs) produced by yogurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences* 62: 323–328.
- Chang, L.I.U., Zhang, Z.-Y., Ke, D., Jian-Ping, Y. and Xiao-Kui, G.U.O. 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*. 22 : 401–412.
- de Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M. and Dias, F. S. 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*. 53 : 96–103.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205 : 31–36.
- Hoier, E. 1992. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia*. 44 : 418–420.
- Handa, S. and Sharma, N. 2016. In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 4–10.
- Martins, L., Otávio, R., Dimitrov, S., Dora, B., Melo, G. De and Augusto, L. 2014. International Journal of Food Microbiology Virulence , antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk &. *International Journal of Food Microbiology*. 185 : 121–126.
- Mohammed, M., Abd El-Aziz, H., Omran, N., Anwar, S., Awad, S. and El-Soda, M. 2009. Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*. 128 : 417–423. .2008.09.022.
- Mead, G.C. and Thomas, N.L. 1973. The bacteriological condition of eviscerated chickens processed under controlled conditions in a spin-chilling system and sampled by two different methods. *British Poultry Science*. 14 : 413–419.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R. and Khosroushahi, A. Y. 2014. Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora. *Journal of Medical Microbiology*. 63 (8): 1044–1051.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*. 114 : 168–186.
- Pieniz, S., Andreatza, R., Anghinoni, T., Camargo, F. and Brandelli, A. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control* 37: 251–256.
- Rehaim, A., Belgacem, Z. Ben, Edalatian, M.R., Martinez, B., Rodriguez, A., Manai, M. and Guerra, N.P. 2014a. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control*. 37 : 343–350.
- Rehaim, A., Ben, Z., Reza, M., Martínez, B., Rodríguez, A., Manai, M. and Pérez, N. 2014b. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control*. 37 : 343–350.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J. 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*. 23 : 179–196.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*. 4 : 199–208.
- Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I. and Swings, J. 2005. Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*. 247 (1): 59–63.
- Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P. and Huys, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 25 (7) : 929–935.
- Weichselbaum, E. 2010. Potential benefits of probiotics—main findings of an in-depth review. *Br J Community Nurs* 15 : 110–112.

Résumé

Le but de cette étude était isoler et de caractériser les bactéries lactiques thermophiles à partir des différents laits fermentés collectés en Algérie. 46 isolats ont été isolés et cultivés dans MRS acétique et LM17. Ces isolats ont été identifiés phénotypiquement en utilisant les caractéristiques physiologiques et biochimiques classique et génotypiquement en utilisant le rep-PCR(GTG)₅ et séquençage du gène 16S DNA . Les résultats d'identification ont permis d'identifier: (06); *Lactobacillus bulgaricus*, (10); *Lactobacillus lactis* (08); *Lactobacillus rhamnosus* (02); *Streptococcus thermophilus* (12); *Enterococcus faecium* ; (08); *Enterococcus faecalis*. Les résultats des analyses technologiques ont montré que les souches qui ont un pouvoir acidifiant élevé étaient (LB1, LB2, LB3) en produisant une concentration d'acidité totale de (70°D, 75°D, 69°D) respectivement, après 24 H de fermentation à 42°C. La détermination de l'activité antagonisme et protéolytique montre que ces souches ont une bonne activité antagonisme de valeur variée entre 5,4 et 2,3 mm de zone d'inhibition et très bonne activité protéolytique de valeur variée entre 21.3 mm et 20.2 mm de zone d'hydrolyse. Les résultats probiotiques ont montré que la majorité des souches sont capables de croître au milieu acide de pH 2 et aux sels biliaires à 0.3% de taux de viabilité varie entre 90% et 68. et de survivre à 65°C.

Mots clés :

Laits fermentés; *Lactobacillus sp*; *Streptococcus sp*; Identification phénotypique; Génotypique; rep-PCR; 16S rDNA; Profils technologiques; Profils probiotiques; Starter culture.