

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université de Blida 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biotechnologie et Agroécologie**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique**

**Option : Biotechnologie Microbienne**

**THEME**

**Isolement et identification des bactéries lactiques à potentiel  
probiotique à partir du lait de chèvre**

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup> Abada Maissa**

**et**

**M<sup>lle</sup> Lettreuch Zahia**

**Soutenu le 12 /07 /2022**

**Soutenu devant les membres de jury**

**M<sup>me</sup> BOUCHNAK.F      Présidente      MCA      U. BLIDA 1.**

**M<sup>me</sup> BENOUSSAID.N      Promotrice      MCB      U. BLIDA 1.**

**M<sup>me</sup> TOUA.D      Examinatrice      MA      U. BLIDA 1.**

**Année Universitaire 2021/2022**

# Remerciements

Nous tenons tout particulièrement à remercier chaleureusement notre promotrice Mme **Ait Saadi N** de nous avoir encadré et dirigé tout au long de l'accomplissement de ce travail, pour sa bienveillance, ses conseils et ses orientations mais surtout sa disponibilité permanente suscite notre administration et pour sa gentillesse et sa sympathie.

Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

A Mme **Bouchnak.F** nous adressons nos remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury.

A Mme **Toua. D** qui nous a fait en acceptant de bien vouloir accepter de juger ce travail.

Nos remerciements vont également Mme **Bouzerini** et A monsieur **Tefahi Djamel** responsable de laboratoire d'hygiène de Blida. Pour les moyens qu'ils ont mis à notre disposition pour pouvoir réaliser le mémoire au sein de leurs établissements dans les meilleures conditions.

Nous remercions particulièrement l'ensemble du laboratoire privé **LABOBIOQUAL** et **ALTESSELAB** qui nous ont permis de finaliser notre travail au sein du laboratoire.

Sans oublier d'adresser nos sincères remerciements **Dr. Hamadache amine, Dr Sebsi Abderrahmane, Mlle Hassi Meriem** qui ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire.

A tous ceux qui nous ont soutenus moralement par leur affection et qui nous ont permis par leurs conseils et leur aide quotidienne de toujours avancer.

Merci à tous !

# Dédicace



*Je dédie ce travail :*

*A celle qui attend mon retour à chaque jour*

*A ma mère : Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.*

*A mon père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin.*

*A mon unique sœur : Nour El Houda pour sa passion de me voir heureux et réussi*

*A tous ma famille : suis très heureux de faire partie*

*A ma copine de mon chemin, ma sœur et Mon binôme Lettreuch Zahia pour tous les moments agréables que nous avons passés ensemble.*

*Je ne saurais oublier de remercier toutes les personnes qui me sont chères, en particulier mes amis(e)*

*Merci aussi à tous ceux qui ont consacré du temps, de l'énergie et de la patience.*

**Maïssa**

# Dédicace



*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect*

## **Mon cher père**

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse*

## **Ma mère**

*A **mon adorable frère**, A **mes chères sœurs** qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A **ma chère belle-mère** qui m'a poussé travailler et à réussir merci pour ton soutien, ton encouragement*

*A **mon fiancé** Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et la présence à mes côtés ma source de force pour affronter les différents obstacles. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A ma copine, ma collègue, mon binôme **Maïssa**, merci pour tous les moments agréables partagés*

*A tous les membres de **NSClub***

*A tous ceux qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.*

**Zahia**

# Isolement et identification des bactéries lactiques à potentiel probiotique à partir du lait de chèvre

## Résumé

La sélection des souches de bactéries lactiques pour leurs aptitudes industrielles ou leurs probables potentialités probiotiques a pris tout son essor dans de nombreux pays. Notre étude s'est intéressée aux bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre.

Au cours de ce travail 20 souches des bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait de chèvre et purifiées (10 souches sur gélose MRS et 10 souches sur gélose M17) puis pré-identifiées par des techniques de microbiologie classique (étude macroscopique, microscopique, tests physiologiques et biochimiques). Ces tests ont révélé que les 10 souches ensemencées sur gélose MRS appartiennent au genre *Pediococcus* et celle de M17 appartient au *Streptococcus thermophilus*. Les 20 souches ont été soumises à des tests d'évaluation de potentiel probiotique : la tolérance aux barrières biologiques (acidité et sels biliaires), résistance aux antibiotiques et aussi l'activité antimicrobienne. Par contre la recherche des bactériocines par la méthode de diffusion en puits a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que 10 souches de *Pediococcus* et 9 souches de *Streptococcus thermophilus* excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus spizizenii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition variables.

L'étude de profil probiotique a montré la capacité des souches à résister aux barrières biologiques du tube digestif et la sensibilité de la plupart des *pediocoques* et *Streptococcus thermophiles* pour la gamme des antibiotiques testées, sauf la résistance de *Streptococcus thermophiles* contre l'Amikacine. Le lait de chèvre est riche en bactéries lactiques qui présentent de bons potentiels probiotiques.

**Mots clés :** bactéries lactiques, probiotique, microbiologie classique, activité antimicrobienne, bactériocines, sels biliaires.

## **Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from goat milk**

### **Abstract**

The selection of lactic bacteria strains for their industrial aptitudes or probable probiotic potentialities has increased in many countries. Our study was interested in lactic bacteria isolated from goat milk.

During this work, 20 strains of lactic acid bacteria were isolated from goat milk and purified (10 strains on MRS agar and 10 strains on M17 agar) then pre-identify by conventional microbiology techniques (macroscopic, microscopic, physiological, and biochemical testing), these tests revealed that the 10 strains plated on MRS agar belong to the genus *Pediococcus* and that of M17 belongs to the *thermophilus streptococcus*. The 20 strains were submitted to tests for evaluation of probiotic potential: tolerance to biological barriers (acidity and bile salts), resistance to antibiotics, and also antimicrobial activity. On the other hand, the research of bacteriocins by the method of diffusion in well gave a negative result for all the studied strains. The results of the antimicrobial activity revealed that 10 strains of *pediococcus* and 9 strains of *thermophilus streptococcus* excreted in the culture medium inhibitory substances capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus Aureus* and *Bacillus Spizizenii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* and *Klebsiella Pneumoiae* with different zones of inhibition.

The probiotic profile study shows the ability of the strains to resist the biological barriers of the digestive tract and the sensitivity of most *pediococcus* and *thermophilic streptococcus* to the range of antibiotics tested, except for the resistance of *thermophilic streptococcus* against Amikacin.

Goat's milk is rich in lactic bacteria which has good probiotic potential.

**Keywords:** lactic acid bacteria, probiotics, classical microbiology, antimicrobial activity, bacteriocins, bile salts.

عزل ونحيد البكتيريا الكتيك المحملة للبروبونيك من حليب الماعز.

## ملخص

انطلق اختيار سلالات البكتيريا الكتيك لقدراتها الصنعية أو إمكاناتها البروبيوتيكية المحملة ني العديد من البلدان، نظرت دراسنا ني بكتيريا الكتيك المعزولة من حليب الماعز.

خالل هذا العمل تم عزل 20 سلالات من البكتيريا الكتيك من حليب الماعز ونزويها 10 سلالات على MRS agar و10 سلالات على M17 agar ( ثم تم تحديدها مسبقاً بواسطة نؤينات علم الأحياء الدقيقة التلويديّة ) الاختبارات العوانية

والمجهرية والنسولوجية والكيمياء الحوية (، كشنت هذه الاختبارات أن سلالات 10 المصنفة على MRS agar تنتمي إلى جنس المملسة وأن سلالة M17 تنتمي إلى المكورات العنقية المحبة للحرارة. تم إخضاع السلالات العشرين الاختبارات لتقييم إمكانات البروبيوتيك: تحمل الحواجز البيولوجية (الحموضة والألمح الصنعية)، ومقاومة المضادات الحوية وأيضاً نشاط مضادات المكروبات. من ناحية أخرى، أعطى البحث عن البكتيريا سونات بطريفة النشرار اليبضي نتيجة سلبية لجميع السلالات المدروسة. أظهرت نتائج النشاط المضاد للمكروبات أن 10 سلالات من المملسة و9 سلالات من المكورات العنقية المحبة للحرارة تنز ني مواد مثبطة لوسط الاستزراع زائدة على تثبيط نمو المكورات العنوية الذهبية و *Bacillus Spizizenii* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas Aeruginosa* و *Klebsiella Pneumoniae* مع تباين مناطق الشيط.

أظهرت دراسة برونابل البروبيوتيك قدرة السلالات على مقاومة الحواجز البيولوجية للجهاز الهضمي وحساسية معظم المكورات العنوية والعنقيات المحبة للحرارة لمجموعة المضادات الحوية المخبرة، باستثناء مقاومة المكورات العنقية المحبة للحرارة ضد الأميكاسين.

حليب الماعز غني ببكتيريا الكتيك التي لديها إمكانات بروبيوتيك جيدة.

الكلمات الرئيسية: بكتيريا حمض الكتيك، البروبيوتيك، علم الأحياء الدقيقة الكالسيك، النشاط المضاد للمكروبات، البكتيريا، الألمح الصنعية.

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine triphosphate.

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone.

°C : Degré Celsius.

DO : Densité optique.

°D : degré Dornic.

FAO : Food and Agriculture Organization.

g : gramme.

GC% : Pourcentage en Guanine et Cytosine.

H : heure.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène.

HCl : acide chlorhydrique.

M17 : Milieu de tarzaghi.

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight.

MH : Mueller Hinton.

ml : millilitre.

Mm : millimètre.

MRS : Milieu de Man Rogosa et Sharpe.

NaCl : Chlorure de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PCR : polymérase Chain réaction.

PH : Potentiel hydrogène.

R : Résistante.

S : Sensible.

Ssp : sous espèce.

T° : Température.

µl : microlitre.

Rpm : Revolutions per minute.

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> . Représentation schématique des deux voies homofermentaire et hétérofermentaire chez les bactéries lactiques ( <b>Bahri, 2014</b> ) .....	8
<b>Figure 2</b> . Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques ( <b>Sauer et al.,2017</b> ).10	10
<b>Figure 3</b> . Morphologie en microscope électronique de <i>Lactobacillus</i> ( x7000) ( <b>Bottazzi Vittorio,1988, Mami ,2013</b> ).....	11
<b>Figure 4</b> . Morphologie en microscope électronique de <i>Streptococcus thermophilus</i> (X4000) ( <b>Liebefeld,2002</b> ) .....	12
<b>Figure 5</b> . Aspect microscopique des cellules de <i>Bifidobacterium animalis</i> (x6000) .....	14
<b>Figure 6</b> . Aspect microscopique des cellules de <i>Pediococcus</i> sp (X7000).....	14
<b>Figure 7</b> . Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie .....	16
<b>Figure 8</b> . Résumé schématique des mécanismes d'action des probiotiques ( <b>Villeger, 2014</b> ). .....	24
<b>Figure 9</b> . Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques ( <b>Mercenier et al., 2003</b> ). .....	25
<b>Figure 10</b> . Préparation des dilutions décimales (photographie originale).....	30
<b>Figure 11</b> . Diagramme d'isolement des bactéries lactiques .....	31
<b>Figure 12</b> . Conservation à long terme des isolats.....	35
<b>Figure 13</b> . Sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques .....	36
<b>Figure 14</b> . Les souches pathogènes ensemencées sur gélose incliné. ....	38
<b>Figure 15</b> . Teste de l'activité antimicrobienne (la méthode de doubles couches).....	38
<b>Figure 16</b> . Teste de l'activité antimicrobienne la méthode des puits .....	39
<b>Figure 17</b> . Observation macroscopique des colonies des souches cultivée.....	42
<b>Figure 18</b> . Cultures des souches sur milieu MRS (A) ou M17 (B) après 24h d'incubation...	43
<b>Figure 19</b> . Les proportions des bactéries lactiques isolées.....	44
<b>Figure 20</b> . Observation microscopique (GX100) .....	44
<b>Figure 21</b> . Résultat de teste catalase.....	45
<b>Figure 22</b> . Résultat de teste oxydase .....	46
<b>Figure 23</b> . Résultat de croissances des souches lactique dans diffèrent température.....	47
<b>Figure 24</b> . Résultat de type fermentaire .....	47
<b>Figure 25</b> . Résultats de la croissance de NaCl à deux concentration 3% et 6.5%.....	48

<b>Figure 26 .</b> Résultat de la sensibilité de <i>Streptococcus thermophilus</i> aux antibiotiques .....	50
<b>Figure 27 .</b> La croissance des souches isolées thermorésistantes .....	51
<b>Figure 28 .</b> Données de tolérance aux sels biliaires de certains isolats lactiques .....	51
<b>Figure 29 .</b> résultat de l'effet antimicrobien par méthode directe des souches testées .....	52
<b>Figure 30 .</b> Pourcentage d'inhibitions des bactérie lactiques .....	53
<b>Figure 31 .</b> Taux d'inhibitions des bactéries lactiques contre les souches pathogènes .....	53
<b>Figure 32 .</b> Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis <i>E. coli</i> .....	54
<b>Figure 33 .</b> Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis <i>Bacillus Spizizenii</i> .....	54
<b>Figure 34 .</b> Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> . .....	55
<b>Figure 35 .</b> Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis <i>Staphylocoque Aureus</i> .....	55
<b>Figure 36 .</b> <i>Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis Klebsiella Pneumoniae</i> .....	56
<b>Figure 37 .</b> Inhibition obtenue par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) par les souches lactiques (LCMR8, LCMR2, LCM1, LCM10) vis-à-vis <i>E. coli</i> (A) et <i>Staphylocoque</i> <i>Aureus</i> (B) .....	57
<b>Figure 38 .</b> Tolérances aux acides des souches lactique.....	58
<b>Figure 39 .</b> Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carret <i>al.</i> ,2002).....	80

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Principales espèces utilisées comme probiotiques ( <b>Robinson, 2002</b> ) -----	19
<b>Tableau 2</b> : Critères de sélections utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques ( <b>Nousiainen et al., 2004</b> ). .....	20
<b>Tableau 3</b> : Principaux mécanismes d'action de probiotiques d'après Ng et <i>al.</i> (2009)-----	24
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques des souches pathogènes -----	29
<b>Tableau 5</b> : Disques d'antibiotiques utilisés -----	36
<b>Tableau 6</b> : Résultats des tests macroscopiques-----	43
<b>Tableau 8</b> : Résultats des caractéristiques microscopique et biochimiques -----	46
<b>Tableau 9</b> : Caractérisation physiologique des isolats lactiques -----	48
<b>Tableau 10</b> : Résultats de l'antibiogramme des isolats lactique -----	49

# Table des matières

Remercîment

Dédicaces

Résumé

المخلص

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction ..... 1

## CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**I.1 Le lait de chèvre ..... 4**

I.1.1 Définition de lait..... 4

I.1.2 le lait de chèvre ..... 4

I.1.3 Composition du lait de chèvre..... 4

I.1.4 Caractéristiques du lait de chèvre..... 5

I.1.4.1 Les critères organoleptiques ..... 5

I.1.4.2 Les caractères physico-chimiques ..... 5

• PH..... 5

• La densité ..... 6

• Acidité Dornic ..... 6

I.1.4.3 Les caractéristiques microbiologiques..... 6

• Flore originelle ..... 6

• La flore contaminante..... 7

• La flore lactique ..... 7

**I.2 Les bactéries lactiques ..... 8**

I.2.1 Historique..... 8

I.2.2 Définition ..... 8

I.2.3 Les caractéristiques .....	9
I.2.4 Classification.....	10
I.2.4.1 Critère de classification .....	10
I.2.4.2 Les principaux genres .....	10
➤ <i>Lactobacillus</i> .....	11
➤ <i>Streptococcus</i> .....	13
➤ <i>Enterococcus</i> .....	13
➤ <i>Leuconostoc</i> .....	14
➤ <i>Weissella</i> .....	14
➤ <i>Lactocoques</i> .....	14
➤ <i>Bifidobactéries</i> .....	15
➤ <i>Pediocoques</i> .....	15
I.2.5 Habitats .....	16
I.2.6 Domaines d'utilisation des bactéries lactique.....	16
I.2.7 Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques .....	17
• Acides organiques (acide lactique et acide acétique).....	17
• Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	18
• Production des bactériocines .....	18
<b>I.3 Les probiotiques.....</b>	<b>19</b>
I.3.1 historique et définition .....	19
I.3.2 Les Principaux Microorganisme probiotiques .....	19
I.3.2.1 Les ferments lactiques .....	20
I.3.2.2 Les bifidobactries.....	20
I.3.2.3 La levure du genre saccharomyces .....	20
I.3.2.4 Les bactéries sporulées .....	21
I.3.2.5 <i>Escherichia coli</i> Nissle .....	21
I.3.2.6 <i>Propionibacterium freudenreichii</i> .....	21

I.3.3 les critères de sélection des bactéries probiotique.....	21
I.3.3.1 Critères de sécurité.....	22
• Identification des souches .....	22
• Innocuité.....	22
• La survie au cours du transit digestif .....	22
• Activité hydrolytique des sels biliaires .....	22
• Adhésion à la muqueuse intestinale .....	22
I.3.3.2 Critères Fonctionnels .....	22
• La survie au cours du transit digestif .....	23
• Activité hydrolytique des sels biliaires .....	23
• Adhésion à la muqueuse intestinale .....	23
• Activité antimicrobienne .....	23
I.3.3.3. Critères Technologiques .....	24
I.3.4 Mécanismes d'action des probiotique .....	24
I.3.5 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé .....	26
I.3.5.1 Effets bénéfiques sur la santé animale.....	26
I.3.5.2 Effets bénéfiques sur la santé humaine.....	26
• L'élimination ou diminution d'intolérance au lactose .....	27
• Effets sur le système immunitaire .....	27
• Maladies allergiques.....	27
• Réduction de trouble associées au système gastro-intestinale .....	27
• Diminutions du taux de cholestérol dans le sang .....	27
• Autre effets bénéfiques liées aux souches probiotiques.....	28
I.3.6 Applications des probiotique.....	28

## **CHAPITRE II : Matériel et méthodes**

<b>II.1 Matériel .....</b>	<b>29</b>
II.1.1 Matériel non biologique .....	29
II.1.2 Matériel biologique.....	29

<b>II.2 Méthode.....</b>	<b>31</b>
II.2.1 Echantillonnage.....	30
II.2.2 Isolement des bactéries lactiques .....	30
• Préparation des dilutions décimales .....	30
• Mise en culture .....	31
II.2.3 Purification des isolats .....	32
II.2.4 Caractérisation et identification des bactéries lactiques .....	32
II.2.4.1 Etude morphologique .....	32
A- Examen macroscopique.....	32
B- Examen microscopique .....	32
II.2.4.2 Examens physiologiques et biochimiques.....	33
• Test de catalase.....	33
• Test d'oxydase.....	33
• Test de croissance à différentes températures .....	34
• Recherche du type fermentaire.....	34
• Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	34
II.2.4.3 Conservation des isolats .....	34
II.2.5 Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées .....	37
II.2.5.1 la résistance aux antibiotiques .....	36
II.2.5.2 Test de thermorésistante .....	37
II.2.5.3 Test de tolérance aux sels biliaires .....	37
II.2.5.4 Test d'activité antibactérienne.....	38
A.Méthode directe de double couche .....	37
B.Méthode indirect des puits.....	39
II.2.5.5 Tolérance aux acides .....	40

### **CHAPITRE III : Résultats et discussion**

<b>III.1 Résultats.....</b>	<b>42</b>
III.1.1 Etude morphologique .....	42

• Résultats de l'examen microscopique .....	44
III.1.2 Résultat d'examens physiologiques et biochimiques .....	45
• Test de catalase.....	45
• Teste oxydase .....	45
• Croissance en différentes températures.....	47
• Résultat du type fermentaire .....	47
• Résultat de la Croissance à différentes concentrations de NaCl. ....	48
III.1.3 Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées .....	49
• Résultats de la thermorésistance.....	51
• Résultat de tolérance aux sels biliaires.....	51
• Résultats de l'activité antibactérienne.....	52
A.Méthode directe de double couche .....	52
B.Méthode indirecte des puits .....	57
• Résultat de la tolérance aux acides.....	57
<b>III.2 Discussion générale .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>64</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# **Introduction**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées (**Dortu et Thonart, 2009**). On les trouve essentiellement dans les produits laitiers (yaourt, fromage, lben...), mais aussi dans d'autres niches écologiques en étant seules ou en association avec d'autres microorganismes bénéfiques comme les levures (**Stoll, 2003**). Elles sont utilisées de différentes manières, comme les ferments ou les starters de fermentation (**Djerdir, 2018**), les agents de bioconservation, et les probiotiques (**Abid, 2020**).

Les aliments fonctionnels dans lesquels sont incorporées des bactéries lactiques probiotiques connaissent depuis une dizaine d'années un très gros essor commercial (**Djerdir, 2018**). Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes vivants qui une fois ingérés en quantités adéquates exercent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (**OMS, 2001**).

Ces effets positifs sont le soulagement des maladies d'origine digestive (comme l'intolérance au lactose), l'amélioration du transit intestinal, la prévention de certaines maladies comme l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang, les diarrhées, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ainsi que d'autres infections d'origine microbienne (infections à *Clostridium difficile* et à *Campylobacter*) (**Gueimonde et al.,2006, Lamer et al.,2020**).

Le criblage d'un grand nombre de bactéries pour identifier des souches probiotiques est de plus en plus effectué du fait de la demande accrue en nouvelles souches probiotiques pour le développement de nouveaux produits probiotiques par les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (**Lamer et al.,2020**).

L'objectif de notre présent travail est d'isoler des bactéries lactiques à partir du lait de chèvre, et d'étudier in vitro leurs potentiels probiotiques.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

## **I.1 Le lait de chèvre**

### **I.1.1 Définition de lait**

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, opaque à odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété particulièrement par la grande mamelle des animaux mammifères femelles pour nourrir leurs nouveaux nés (**Kumar et al., 2016**). Le lait est un liquide biologique comestible, et une matière première de base pour tous les consommateurs. Il peut être incorporé dans les collations, dans les repas ou transformé en produits dérivés. Généralement, le terme 'lait' évoque le lait de vache (**Derouiche et Zidoune, 2015**). Le lait de cette espèce laitière est très revendiqué par les consommateurs du monde entier. Beaucoup de gens pensent que le lait de vache est le meilleur lait, or, le lait de chèvre est d'autant plus intéressant et plus riche que ce dernier (**Aries et Soufane, 2018**).

### **I.1.2 Le lait de chèvre**

C'est une source de bienfaits pour la santé de l'homme. Le lait de chèvre frais possède une acidité, soit un pH de 6,6 environ (proche de la neutralité donc il n'y a pas d'acide lactique) ou 16°D. On peut éviter le développement des germes de contamination (coliformes, pathogène) par l'acidification des produits laitiers, par abaissement du pH (**CORCY, 1991**).

En Algérie, le lait de chèvre a longtemps été marginalisé, développé à l'échelle familiale dans les régions montagneuse et consommé à l'état cru ou fermenté (**Boumendjel et al., 2017**).

### **I.1.3 Composition du lait de chèvre**

Le lait contient des nutriments essentiels et est une source importante d'énergie alimentaire, de protéines de haute qualité et de matières grasses. Le lait peut apporter une contribution significative aux besoins nutritionnels recommandés en calcium, magnésium, sélénium, riboflavine, vitamine B12 et acide pantothénique.

Le lait de chèvre se rapproche plus du lait de vache que celui de la femme. (**FAO, 2017**).

Selon Fredot, (2009) le lait en général est constitué de quatre phases :

- Une émulsion de matières grasses constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D) ;
- Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
- Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait « protéines solubles lactose, vitamine (B, C), sels minéraux, azote non-protéique » ;
- Une phase gazeuse composée d'O<sub>2</sub>, d'azote et de CO<sub>2</sub> dissous qui représentent environ 5 % du volume du lait.

Ces phases sont en suspension les unes dans les autres. Il existe des facteurs qui permettent de rompre cette suspension (pH acide, présure) qui fait coaguler la phase colloïdale et qui sera utilisée lors de la fabrication des dérivés du lait.

### I.1.4 Caractéristiques du lait de chèvre

#### I.1.4.1 Les critères organoleptiques

Selon Sahraoui et *al.* (2016), les caractéristiques organoleptiques sont :

- **Couleur** : blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas du  $\beta$ -carotène.
- **Odeur** : fraîchement traité, le lait de chèvre a une odeur assez neutre parfois en fin de lactation, il a une odeur dite Caprique.
- **Saveur** : douceâtre agréable particulièrement au lait. Le lait de chèvre fraîchement traité possède une saveur plutôt neutre ; par contre, après stockage au froid il acquiert une saveur caractéristique. Dans certains pays anglo-saxons, la saveur du lait de chèvre est un critère de sélection car sa commercialisation en état est très répandue.
- **Aspect** : propre, sans grumeaux.

#### I.1.4.2 Les caractères physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont :

- **Ph**

Le PH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (HR 3ROP + P) et donc une diminution du pH. Le pH de lait de chèvre, se caractérise par des valeurs allant de 6,45 à 6,90 (Amiot et *al.*, 2002).

- **La densité**

C'est le rapport du poids de l'élément recherché à un volume donné sur le poids de l'eau du même volume. La densité varie de 1,028 à 1,035 (Amiot et al., 2002). Suivant deux facteurs à savoir les solides non gras et la matière grasse (Boumendjel et al., 2017). La densité du lait de chèvre se situe entre 1,0265 et 1,031 (Amroun et Zerrouki, 2014).

- **Acidité Dornic**

L'acidité Dornic est relative à la concentration d'acide lactique présent dans le lait issu de la fermentation du lactose par des bactéries (Amiot et al., 2002). L'acidité Dornic est généralement de 18°D, ceci, dépend de l'espèce laitière. L'acidité Dornic du lait de chèvre varie de 12,85 à 18,88 (Boumendjel et al., 2017).

### **I.1.4.3 Les caractéristiques microbiologiques**

Le lait de chèvre contient une microflore naturelle (bactéries, moisissures et levures). Certains germes présents dans les produits laitiers sont même indispensables à la transformation du lait et d'autres germes sont à l'inverse à rôle nuisible (Champagne et Moineau, 2003).

- **Flore originelle**

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (Keskin et al., 2004). Le lait qui sort du pis est pratiquement stérile (Belfar, A et Fferhatia 2020). Les genres dominants de la flore originelle sont principalement des microorganismes utiles pour la transformation ultérieure du lait frais tel que *Lactobacillus* et *Streptococcus* (flore dite acidifiante ou lactique) (Lapointe-Vignola et al. 2002).

- **La flore contaminante**

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation (**Heuchel et al., 2001 ; Michel,2012**). La contamination exogène est en général massive par rapport à la concentration d'origine mammaire (**Wissam, s.,Assia 2020**). Elle est extrêmement variable en importance suivant les conditions de production et de conservation du lait (**Yadav et al., 2016**). Les bactéries d'altération atteignent le produit fini durant la transformation ; causant ainsi une forte acidification et une formation d'odeur désagréable, le cas des coliformes. Ces derniers sont des indicateurs de contamination fécale à prendre en compte (**Lamontagne et al., 2002**). De même pour les bactéries pathogènes, elles sont d'origine externe et peuvent être dangereuse pour la santé publique l'exemple de *Staphylococcus aureus*, *Salmonelles*, *Escherichia coli*... (**Aissaoui et al., 2019**).

- **La flore lactique**

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et Holzapfel, 1997**), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut « Generally Recognized As Safe », excepté pour les entérocoques (**Klaenhammer et al., 2005**). Elles ont un rôle fondamental dans les équilibres microbiens du lait. Ainsi, leur développement excessif ou insuffisant peut induire des défauts de texture et de goût des fromages. Elles constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (**Caridi et al., 2003**).

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutéline, du diacétyle et des bactériocines (**Dortuet Thonart, 2009**).

## I.2 Les bactéries lactiques

### I.2.1 Historique

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). Mais leur utilisation n'a été que depuis 4000 ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant d'avoir une meilleure qualité et d'avoir une meilleure conservation des aliments à base de viande, des poissons, des légumes, des fruits et de lait (**Saloffe, 1994**).

C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin de 19<sup>ème</sup> siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide, d'autres ont conclu que la présence des bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation des crèmes (**Storch, 1890 ; Conn, 1889 ; Wigmann, 1896 ; De Roissard et Luquet, 1994**). Ainsi, selon Lister (**1873**) ; la première culture pure de bactéries lactiques était celle de *Bacterium lactis* (probablement *Lactococcus lactis*) (**Metchnikoff, 1908 ; Sandine et al., 1972 ; Carre et al., 2002**).

### I.2.2 Définition

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules procaryotes, non pathogènes regroupant un ensemble d'espèces hétérogènes (**Badis et al., 2005 ; Labioui et al., 2005**). Ces microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires (**Labioui et al., 2005 ; Dortu et Thonart, 2009**). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu en vitamines (B et K), en acides aminés, en composés organiques (acides lactique et acétique), en enzymes (lactase) et en bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (**Dib et al., 2012**). Les bactéries lactiques sont bien tolérées par les animaux et l'homme ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS « Generally Recognized As Safe » (**Adams, 1988**), excepté certaines espèces d'entérocoques et certains ont obtenu le statut QPS (Quality Presumption of Safety) (**Streit, 2008**). Actuellement, ces bactéries lactiques interviennent dans l'industrie alimentaire sans oublier leur utilisation et effet dans la santé (**Djerdir, 2018**).

### I.2.3 Les caractéristiques

Les bactéries lactiques ont été définies par Orla-Jensen (1919) et caractérisées dont deux caractères principaux ne peuvent pas être contestés : le gram positif et la non sporulation. Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets, non mobile, oxydase négative, et anaérobie, catalase négative à l'exception de certains genres de pseudocatalase, tolérants à ph acides. Elles sont mésophiles ou thermophiles qui peuvent se développer à des températures comprises entre 10°C et 45°C (Corrieu et Luquet, 2008 ; Natachaet *al.*, 2017). Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (Muto et Osawa, 1987).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On distingue trois groupes (Figure 1) :

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- Hétérofermentaires facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et de l'acide acétique.
- Hétérofermentaires strict : elles produisent en plus, de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.

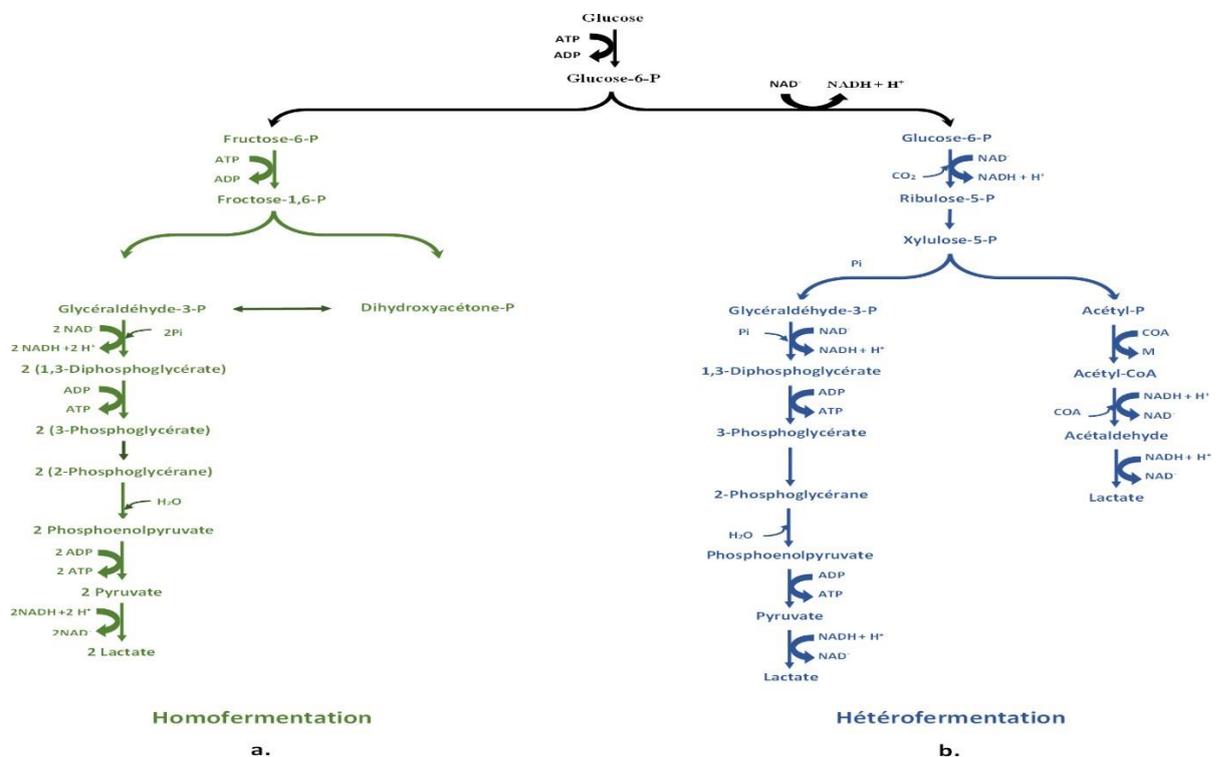


Figure 1 . Représentation schématique des deux voies homofermentaire et hétérofermentaire chez les bactéries lactiques (Bahri, 2014).

## I.2.4 Classification

### I.2.4.1 Critère de classification

La classification phénotypique des bactéries lactiques est principalement basée sur des caractéristiques phénotypiques (la morphologie) et biochimiques [la méthode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la capacité à se développer sous une concentration élevée en sel (6,5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins à l'éthanol, et à l'acide lactique. Les marqueurs de classification chimique tels que la composition en acides gras et la composition de la paroi cellulaire peuvent également être utilisés pour la classification (**König et al., 2017**).

Avec le temps, ces caractéristiques sont devenues insuffisantes pour la classification des espèces. Cependant, avec l'apparition de nouvelles technologies de PCR et de séquençage de l'ADN du gène de l'ARNr 16s, l'identification est devenue pratique, simple et précise (**Holzappel et Wood, 2014**). Plus récemment, l'identification s'est basée sur des outils protéomiques comme (MALDI-TOF) qui est une méthode simple, rapide et peu coûteuse et qui donne des pourcentages élevés des identifications correctes (**Benmechernene et al., 2014 ; Mokdad, 2020**).

### I.2.4.2 Les principaux genres

Actuellement les bactéries Lactique se trouvent dans deux embranchements distincts : Firmicutes et Actinobacteria (figure2). L'embranchement des Firmicutes renferme les genres les plus importants : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui appartiennent à l'ordre des Lactobacillales, caractérisé par une faible teneur en GC (31-49%) (**Russell et Gould, 2012 ; Mokoena, 2017**). L'embranchement des Actinobacteria renferme le genre *Bifidobacterium*, qui est caractérisé par une teneur élevée en GC (58-61%). Elles sont groupées en six familles *Aerococcaceae* (7 genres), *Carnobacteriaceae* (16 genres), *Enterococcaceae* (7 genres) *Lactobacillaceae* (3 genres), *Leuconostocaceae* (4genres) et *Streptococcaceae* (3 genres) (**Klaenhammer et al., 2005 ; Horvath et al., 2009 ; Holzappel et Wood, 2014**).

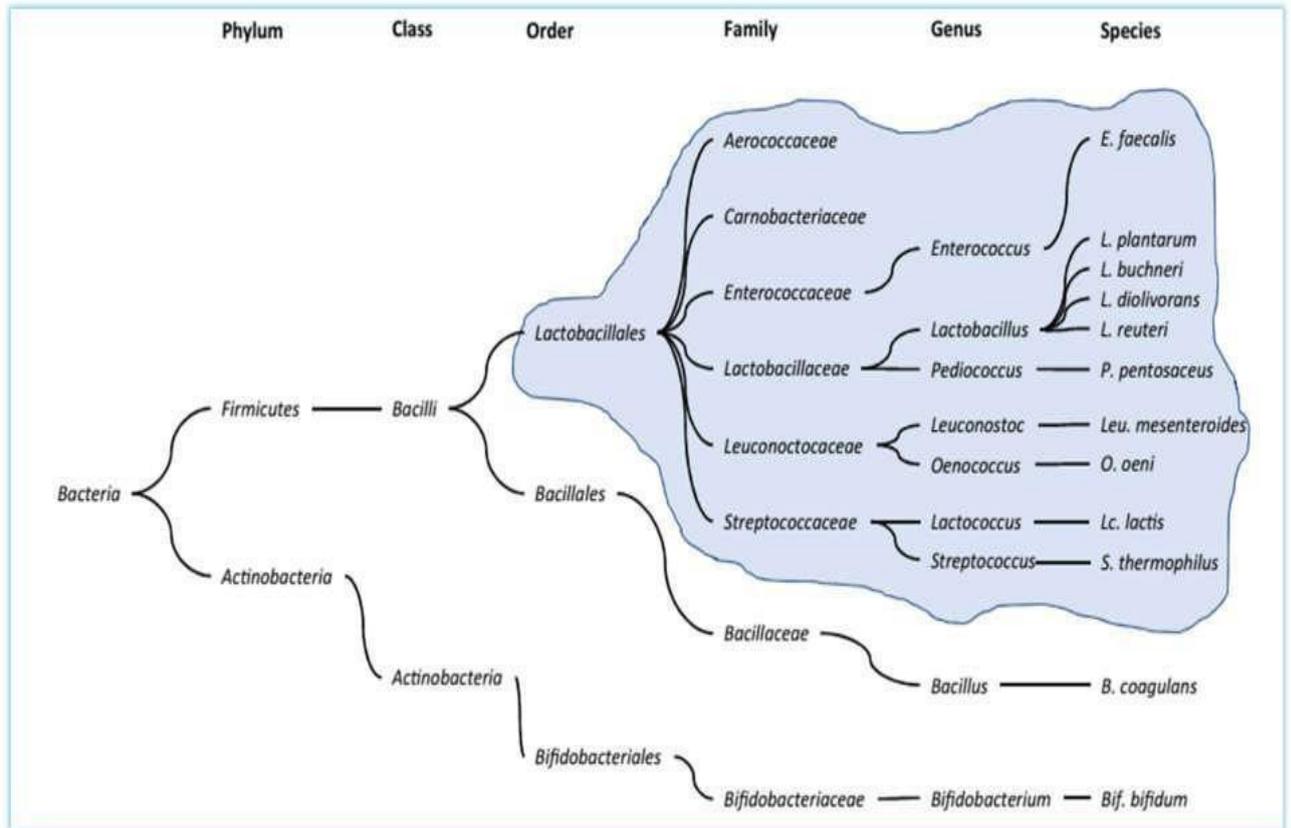


Figure 2 . Aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques (Sauer et al.,2017).

### ➤ *Lactobacillus*

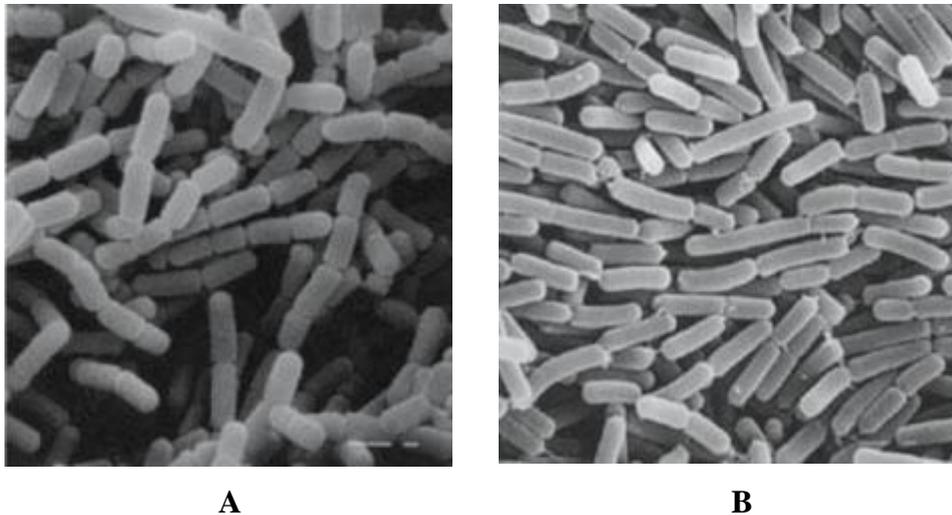
Découvert pour la première fois par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement plus de 200 espèces reconnues (Diaz et al., 2020), qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Zhang et al.,2014). Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques et quantitativement le plus important des germes du groupe des bactéries lactiques. Leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fines et allongées (Figure 3). On rencontre des *Lactobacilles* dans la flore intestinale et la flore vaginale (Zhang et Cai, 2014).

La plupart des *Lactobacillus* se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55°C quand le pH optimum de croissance est de 5,5 (Cholet, 2006).

Les *Lactobacilles* se subdivisent en trois sous-groupes (Salminen et al. 2004 ; Zhang et Cai, 2014).

- Groupe N°1 : anciennement appelé *Thermobacterium*. Il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate.
- Groupe N°2 : anciennement appelé *Streptobacterium*. Il rassemble les lactobacilles hétéros fermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments.
- Groupe N°3 : anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. La fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO<sub>2</sub>.

Cette classification est la seule reconnue, bien qu'elle soit imparfaite car le séquençage de l'ADNr 16S et le contenu en GC % qui varie énormément d'une espèce à une autre (32 à 53%) et l'absence d'homologie ADN-ADN significative entre beaucoup d'espèces, sont aussi le reflet d'une parenté phylogénique éloignée (Hydersah, 2010).



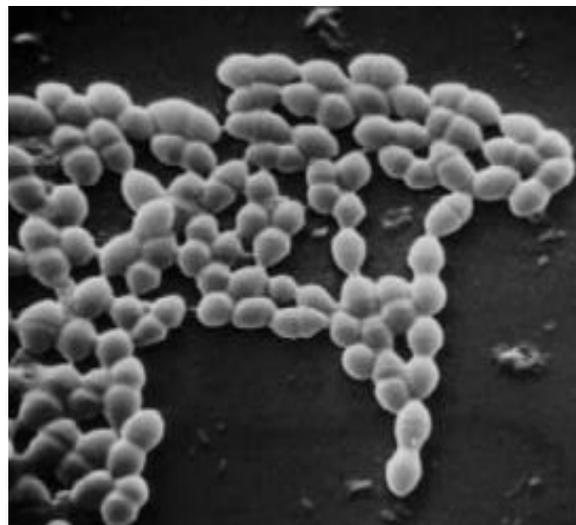
**Figure 3 :** Morphologie en microscope électronique de *Lactobacillus* (x7000) (Bottazzi Vittorio,1988, Mami ,2013).

A : *Lactobacillus casei*    B : *Lactobacillus acidophilus*

➤ ***Streptococcus*** :

Ces bactéries sont des cocci sphérique ou ovoïdes regroupés en paires ou en chainettes ; en général immobiles ; à partir des glucides leur métabolisme est homofermentaire. Elles produisent un certain nombre d'agents antimicrobiens (**Hols et al., 2005**).

La température optimale de croissance est de 37°C et le pH est de 9.6 (**Badis et al., 2005**). Ce sont des commensales ou pathogènes chez l'homme et les animaux. La seule espèce de Streptocoque utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (**Chandan et al., 2017**) (Figure4).



**Figure 4** : Morphologie en microscope électronique de *Streptococcus thermophilus* (X4000) (**Liebefeld,2002**).

➤ ***Enterococcus*** :

Le genre *Enterococcus* se caractérise par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5% NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement (**kumar, 2014**).

Il Comprend un groupe omniprésent de bactéries à Gram positif qui présentent un grand intérêt pour la santé humaine en raison de leur rôle d'agents causals majeurs dans les infections associées aux soins de santé. Les entérocoques sont des espèces résilientes et polyvalentes capables de survivre dans des conditions difficiles, (**Monica, et louis 2020**).

➤ ***Leuconostoc* :**

Les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* sont généralement de forme sphérique. Ce sont des bactéries hétérofermentaires, capables de produire de l'éthanol, de l'acide lactique, de l'acide acétique et du dioxyde de carbone, entre autres métabolites (**Bjorkroth et Hozapfel, 2017**).

Il se développe sur une plus large gamme de concentrations de sel (et de sucre) que toute autre bactérie lactique ; il peut tolérer des températures de 3,9 °C à 30 °C ; et il peut pousser dans une large gamme de pH (4,5–7,0 bien qu'il prospère à 5,5–6,5) (**Swsen, 2012**).

➤ ***Weissella* :**

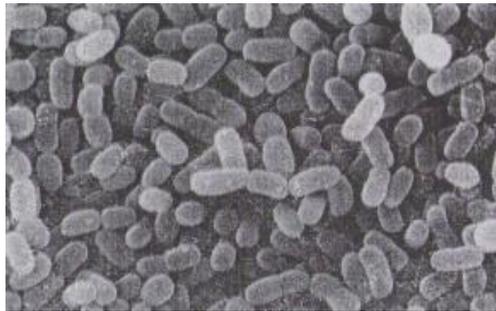
Les bactéries assignées au genre *Weissella* sont des cellules Gram-positives, catalase-négatives, non endosporeées, de morphologie coccoïde ou en forme de bâtonnet (**Collins et al., 1993 ; Björkroth et al., 2009, 2014**) et appartiennent au groupe de bactéries généralement connues sous le nom de bactéries lactiques. Sur le plan phylogénétique, les *Weissella* appartiennent aux *Firmicutes*, à la classe des Bacilli, à l'ordre des Lactobacillales et à la famille des *Leuconostocaceae* (**Oliveira et al., 2015**). Ils sont obligatoirement hétérofermentaires, produisant du CO<sub>2</sub> à partir du métabolisme des hydrates de carbone (**Tohno et al., 2015**).

➤ ***Lactocoques* :**

C'est des bactéries lactiques non mobiles, non sporulées, à faible GC% et à Gram positif. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+) à partir du glucose (**Kim, 2014**). Seul, *Lactococcus lactis* ssp, *lactis* biovar et *diacetylactis* produit le diacétyle (**Teuber et Geis, 2006**). Elles sont toutes mésophiles, la température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C (**Mofredj et al., 2007 ; Kim, 2014 ; Yu et al., 2017**). Elles sont utilisées comme culture starter dans la production d'une large gamme de produits laitiers fermentés où elle contribue à la conservation des aliments (**Smid et Kleerebezem, 2014**).

➤ ***Bifidobactéries*** :

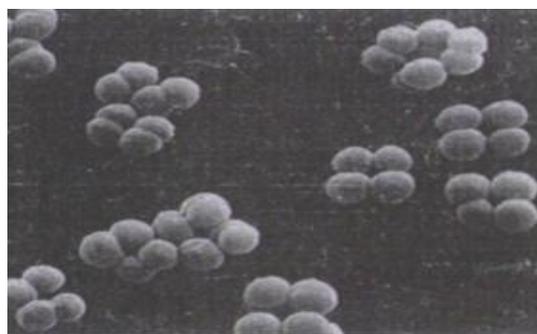
Le genre *Bifidobacterium* est un groupe probiotique essentiel dans les produits laitiers (Issa et Tahergorabi, 2019). Ils sont des bacilles à Gram positif (Figure 5), anaérobies stricts, à haut pourcentage en guanine-cytosine, non sporulés, de forme irrégulière, comportant souvent des ramifications (Ho et al., 2007). Ces bactéries glucidolytiques dégradent les hexoses par une voie particulière. Ils ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C (Axelsson, 2004 ; Biavati et Mattarelli, 2015).



**Figure 5:** Aspect microscopique des cellules de *Bifidobacterium animalis* (x6000) (roh et Bouix, 1993).

➤ ***Pediocoques***

Les *Pediocoques* sont, comme leur nom l'indique, des cocci. Ils sont acido-tolérants et disposés en tétrade et en paires lors de l'observation microscopique (Figure 6). Le genre *Pediococcus* fait aussi partie de la classe des Bacilli, l'ordre des *Lactobacilles* mais de la famille I des *Lactobacillaceae* (Prescott et al., 2003). Les *pédiocoques* sont anaérobies facultatifs, non mobiles. La majorité des espèces peut croître entre 10 et 45°C et dans un milieu contenant 6,5% de NaCl (Holzapfel et al., 2009 ; Lahtinen et al., 2012).



**Figure 6 :** Aspect microscopique des cellules de *Pediococcus* sp (X7000) (Leveau et Bouix, 1993).

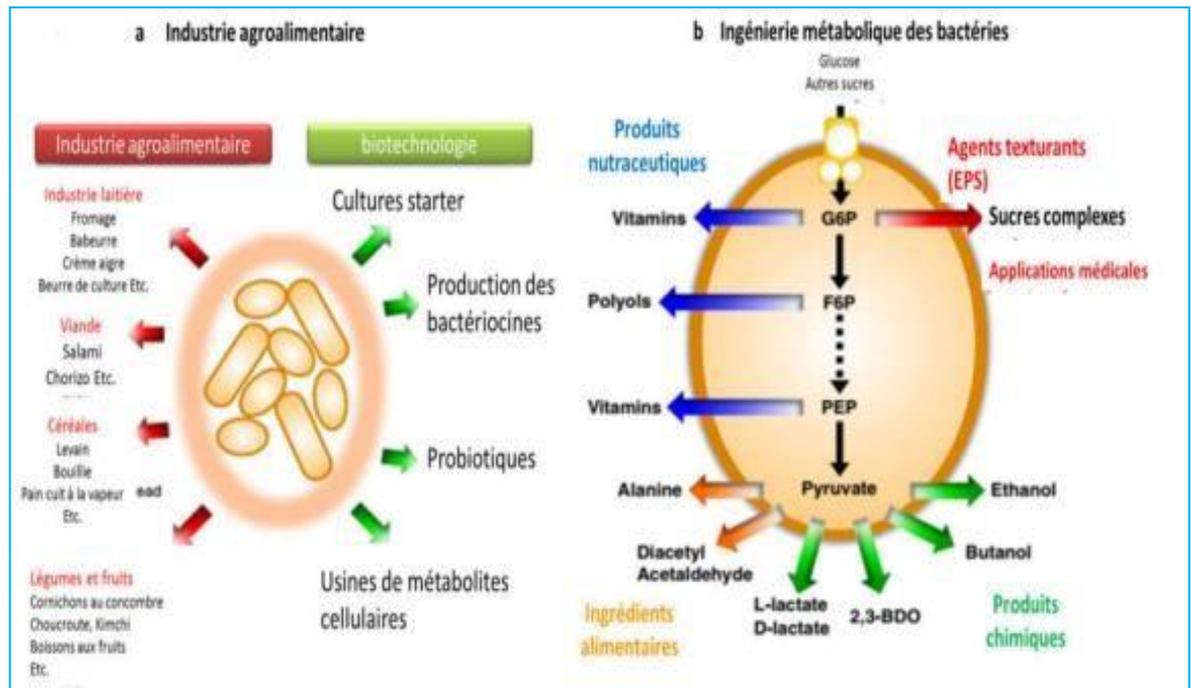
### **I.2.5 Habitats**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, elles peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physicochimique et biologique (**Dortu et Thonart, 2009**). Elles ont pour habitats de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (la peau, cavité vaginale et buccale, fèces et le lait) (**Boukhalfi, 2020**).

### **I.2.6 Domaines d'utilisation des bactéries lactique :**

Les Bactéries lactiques sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles permettent de changer la saveur de l'aliment, sa texture et aussi comme additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (**Sánchez., 2009**). D'autre part, les bactéries lactiques produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments. Elles jouent aussi un rôle très important dans la fermentation des aliments (fruits, légumes, viandes, lait ...etc.), en améliorant leur valeur nutritionnelle, leur digestibilité et en développant aussi leurs propriétés organoleptiques. Ceci est dû à l'action des enzymes glycolytiques, lipolytiques et protéolytiques. Ces enzymes transforment les nutriments en composés ayant des propriétés sensorielles et qui à la fin modifient la structure, l'arôme de l'aliment fermenté et augmente la durée de leur conservation sans ajout de conservateurs chimiques (**Todorov et al., 2012**) (**Figure 7**).

L'intérêt des bactéries lactiques en domaine médical était utilisé pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux, et aussi dans le cadre des probiotiques (**Boumediene, 2013**). D'autres études, ont démontré le potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée (**YAN Boumediene et al, 2014**). Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années, des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques (**LAIRINI et al., 2016**). Les bactéries lactiques sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (**Rodriguez, 2003**), et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (**Langella., 2001**) (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.

Abréviations : G6P glucose 6-phosphate ; F6P, fructose 6-phosphate, et PEP, phosphoenolpyruvate

### I.2.7 Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines, qui sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui et al., 2005 ; Benyoucef, 2018).

#### ➤ Acides organiques (acide lactique et acide acétique) :

Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation alimentaire et permettent d'inhiber la croissance des bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. Sous la forme indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor et al., 2006). Ainsi, l'accumulation d'acide organique est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire (Hutkins, 2006).

La production des acides lactique et acétique et donc l'abaissement du pH ont un effet essentiellement sur les microorganismes acido-sensibles tels que *Pseudomonas*, *Salmonella*, *E. coli* et *Clostridium*. L'acide lactique est toxique pour beaucoup de bactéries mais aussi des champignons et des moisissures (Haller et al., 2001). L'acide lactique n'est pas le seul acide inhibiteur. En effet, quand l'aliment contient peu de sucres, l'inhibition sera partiellement causée par d'autres produits tels que l'acide formique, l'acide benzoïque et le diacétyl (Corsetti et al., 2015 ; Benyoucef, 2018).

### ➤ Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène lors de l'action de certaines enzymes comme le nicotinamide adénine hydroxyle dinucleotideoxydase (NAHD), la flavonoprotéine oxydase et le glycérophosphate oxydase (Ross et al., 2002). La bactérie lactique ne produira pas de catalase pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène (Benyoucef, 2018).

### ➤ Production des bactériocines :

Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines (Belguesmia et al., 2011). Les bactériocines, toxines peptidiques produites par les bactéries, offrent un potentiel prometteur comme substituts ou conjugués aux composés bioconservateurs et thérapeutiques. Ces bactériocines sont des divers groupes de peptides antimicrobiens et sont une caractéristique importante dans la sélection de souches probiotiques (Malik et al., 2012).

Les bactériocines peuvent être utilisées comme additifs alimentaires. Actuellement, la nisine est un agent de conservation. La production de bactériocines améliore la capacité du lactobacillus à contrôler la croissance des bactéries pathogènes et des bactéries alimentaires dans les produits alimentaires (Wan, 2017).

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle comme alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010).

## I.3 Les probiotiques

### I.3.1 historique et définition

L'histoire de probiotique remonte à des centaines d'années avec la consommation des aliments fermentée, leurs bienfaits sur la santé ont été connus depuis longtemps (**Ranadheera et al., 2010 ; Gharib, 2020**).

La possibilité que la consommation de bactéries inoffensives exerce des effets bénéfiques pour l'être humain a été postulée d'abord par Elie Metchnikoff (1845 - 1916). Lorsqu'il a observé qu'un nombre surprenant de personnes en Bulgarie vivait plus de 100 ans. Cette longévité ne pouvait pas s'expliquer par les avancées de médecine moderne, car la Bulgarie, l'un des pays les plus pauvres d'Europe à l'époque, ne bénéficiait pas de telles avancées.

Le Dr. Metchnikoff a associé l'augmentation de la longévité observée à la consommation des microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés car ils les consomment trop. De plus, il a supposé que l'acide lactique produise, ainsi que d'autres facteurs non identifiés, agirait de façon synergique pour inhiber la croissance de bactéries de la putréfaction dans le côlon (**Singh et al., 2011 ; Gharib, 2020**).

Le terme probiotique a vu le jour en 1965 par opposition aux antibiotiques. Il a été défini par Lilly et Stillwell comme des facteurs dérivés des micro-organismes et stimulant la croissance des autres micro-organismes (**Dolié, 2018**). Ce terme dérivé du grec « pro bios », qui signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition aux effets délétères des antibiotiques.

En 2002 que la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont formulé la définition suivante : « microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère » (**Ait-Belgnaoui et al., 2006**).

### I.3.2 Les Principaux Microorganisme probiotiques

Plusieurs espèces de bactéries ou levures sont considérées comme étant probiotiques. Malgré cette grande diversité, ce sont les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont les plus étudiés (**Rayavarapu et Tallapragada, 2019**).

Bien que d'autres espèces des genres : *E. coli*, *Bacillus*, et également *Sacharomyces* (Soccol et al., 2014 ; Prado et al., 2015), ainsi des *Pediccocus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* et *Streptococcus* (tableau 1) (Shah, 2007 ; Ranadheera et al., 2010).

**Tableau 1** : Principales espèces utilisées comme probiotiques (Robinson, 2002).

<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Autre</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus ssp</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Escherichia coli souche nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbrueckii subso. Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Leuonostoc mesenteroides</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>

### I.3.2.1 Les ferments lactiques

Ce sont des microorganismes capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose ; ils sont regroupés en deux catégories :

- A) les lactobacilles : Lactobacilles *bulgaris*, *Lactobacillus acidiphilus*, *Lactobacillus caséi*.
- B) Les lactocoques : *Entéroccocus*, *streptococcus* (Mermouri, 2018).

### I.3.2.2 Les bifidobactries

Les bifidobactéries sont souvent citées comme ayant de fortes capacités probiotiques. Cependant, l'utilisation industrielle de ces souches n'est pas aussi répandue que celles des lactobacilles (Muller et al., 2009).

### I.3.2.3 La levure du genre saccharomyces

Dès 1953, la levure probiotique, *S. boulardii*, a été commercialisée comme médicament pour prévenir la diarrhée aiguë. Depuis lors, le microorganisme a été considéré dans plus de 100 études cliniques analysant ses bienfaits pour la santé intestinale et la levure probiotique est reconnue par la communauté médicale et scientifique (Hosjak, 2018). *S. boulardii* est un probiotique sûr et fiable, qui contribue à l'amélioration de plusieurs problématiques gastro-intestinales (charnile,2021).

### I.3.2.4 Les bactéries sporulées

Représentées essentiellement par *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Mermouri, 2018). Les spores de *B. clausii* sont utilisées comme suppléments médicaux commercialisés sous le nom Enterogermina, il est indiqué pour aider à prévenir la gastro-entérite chez les nourrissons et les enfants (Cutting, 2011 ; Belhamra, 2017).

### I.3.2.5 *Escherichia coli* Nissle

C'est une bactérie Gram négatif non pathogène appartenant à la famille d'entérobactéries. C'est une souche probiotique bien connue avec multiples effets bénéfiques sur l'hémostasie intestinale. Contrairement à d'autre souche *d'E coli*, elle ne produit pas de facteurs de virulence (Schultz, 2008 ; Belhamara, 2017).

### I.3.2.6 *Propionibacterium freudenreichii*

Est une bactérie non mobile à Gram positif. Elle est chimiohétérotrophe, présente un effet prébiotique car elle stimule la croissance des bactéries saines, les bifidobactéries (Bouglé, 1999 ; Cousin, 2010).

## I.3.3 les critères de sélection des bactéries probiotique

Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation. Pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée suivant les recommandations de la FAO/OMS (Izquierdo, 2009 et Li et al. 2019) (Tableau2).

**Tableau 2** : Critères de sélections utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen et al., 2004).

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité	Suivit pendant le passage par l'estomac et le duodénum
Résistance aux sels biliaires	Suivit pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir du glucose et de lactose)	Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substances antimicrobiennes	Inhibition du développement des germes pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologique	Stabilité, croissance sur une large pathogènes dans le produit, résistance aux bactériophages.

### I.3.3.1 Critères de sécurité

Des principes généraux et des critères pratiques ont été mis en place *in vitro* pour sélectionner les souches probiotiques les plus sécuritaires :

- **Identification des souches**

Parmi les critères liés à la sécurité, l'identification taxonomique de la souche est une étape importante dans l'établissement de nouvelles souches potentiellement probiotiques.

Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et confrontée à une nomenclature actualisée (FAO/WHO 2002). Actuellement, le séquençage de la région 16S est la méthode moléculaire de référence pour identifier l'espèce d'une souche, mais cette méthode est longue et requiert une large collection de souches de référence (FAO WHO 2002).

- **Innocuité**

Un microorganisme probiotique doit présenter une innocuité totale pour le consommateur et ne présenter aucune propriété indésirable possible comme la résistance aux antibiotiques, cytotoxicité, activité hémolytique (Dalli *et al.*, 2017), ainsi l'absence de transfert des gènes entre les probiotiques et les bactéries du microbiote...etc (Burgain, 2012silv).

- **Origine**

Les souches probiotiques d'origine humaine sont plus compatibles avec le tractus intestinal humain, elles peuvent cependant être d'une origine autre qu'humaine (animale, alimentaire, ou végétale), tant qu'elles ne sont pas reconnues comme étant dangereuses (Piquepaille, 2013).

### I.3.3.2 Critères Fonctionnels

Pour être en conformité avec la définition de la FAO/OMS (2001), les souches probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs sur la santé de l'hôte (Turner *et al* ; Mattia pia Arena *et al.*, 2018), les critères fonctionnels à vérifier sont les suivants :

- **La survie au cours du transit digestif**

Un microorganisme probiotique doit impérativement franchir l'estomac qui constitue une imposante barrière (Morelli, 2007). Après le stress acide de l'estomac, les microorganismes probiotiques sont mélangés dans de la bile et dans le jus pancréatique qui contiennent des sels biliaires et des enzymes pancréatiques affectant sévèrement la viabilité de ces bactéries (Shima et al., 2009). Plusieurs études ont démontré le pouvoir de certaines souches de *Lactobacillus* à résister aux stress du transit digestif. Ce pouvoir est dû certainement à leur origine humaine mais aussi grâce à la protection qu'offrent les aliments dans lesquels ils sont adjuvés (Ross et al., 2005).

- **Activité hydrolytique des sels biliaires**

Le flux biliaire assure un rôle physiologique très important puisqu'il facilite la digestion des composés lipophiles provenant de l'alimentation. C'est également un agent antimicrobien influençant l'établissement du microbiote intestinal (Begley et al., 2005). L'hydrolase des sels biliaires sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. Un certain nombre de BSH ont été identifiés et caractérisés chez des bactéries probiotiques. La capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considéré comme critère de sélection des souches probiotiques (Lahmer et al., 2020).

- **Adhésion à la muqueuse intestinale**

Une bonne adhésion du probiotique représente sa capacité à se fixer aux cellules de l'intestin. Si l'adhésion est satisfaisante, le temps de présence des souches probiotiques dans l'intestin sera augmenté. En effet, un probiotique ne fait que transiter dans l'organisme (sauf dans le cas de dosages très élevés). Une bonne adhésion permet d'optimiser l'interaction entre les bactéries du microbiote et les systèmes liés (système immunitaire notamment) (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011).

- **Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne est l'un des critères de la sélection des souches probiotiques. Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricides ou bactériostatiques comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (Belhamra, 2017).

### I.3.3.3. Critères Technologiques

En plus des critères de sécurité et des critères fonctionnels qui ont déjà été cités, de nombreux aspects technologiques doivent être pris en compte pour la sélection des souches probiotiques, et ces aspects sont les suivants :

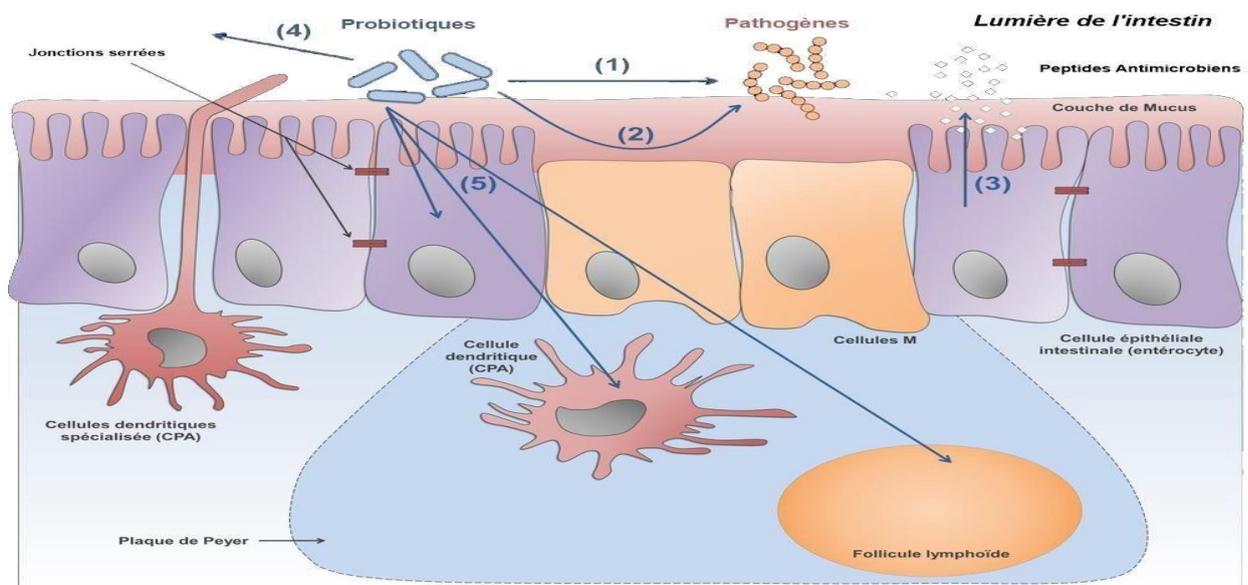
- Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer des substances toxiques comme amines biogènes. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui ne possèdent pas le statut GRAS à l'exception de certains Entérocoques (**Dib, 2015**).
- Viabilité et stabilité des microorganismes (**Harzallah et Belhadje, 2013**).
- Conservation des propriétés probiotiques dans le produit fini et les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation de produit et doivent être fournies en dosage appropriés jusqu'à la date d'expiration (**Ahmadova, 2013**).
- Attribution des propriétés organoleptiques qui attirent le consommateur. Les produits à base de probiotiques doivent posséder de bonnes propriétés organoleptiques, surtout le goût (**Bahri et al., 2014**).
- Résistance aux phages (**Mattila-Sandholm et al., 2002**).

### I.3.4 Mécanismes d'action des probiotique

Les bactéries probiotiques pouvaient avoir de multiples et divers effets sur l'organisme de l'hôte. Différents microorganismes peuvent influencer l'environnement luminal intestinal, les fonctions de barrière de l'épithélium et de la muqueuse, ainsi que le système immunitaire associé (**Robin et Rouchy, 2001**). Les probiotiques peuvent exercer leurs effets sur différents types cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires innée et adaptative, comme les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les lymphocytes B, les lymphocytes T (incluant les cellules T régulatrices), et les cellules NK (**Corr et al. 2009**). Le Tableau 3 présente de manière simplifiée les principaux mécanismes d'action des probiotiques. Ces mécanismes sont illustrés sous forme de schéma (**Figure 8**).

**Tableau 3 :** Principaux mécanismes d'action de probiotiques d'après Ng *et al.* (2009)

Mécanismes d'action des probiotiques	
<b>Activité antimicrobienne</b>	Diminution des Oh luminal par la production de métabolites acides
	Sécrétion de peptides antimicrobiens
	Inhibition de l'invasion bactérienne par compétition pour les nutriments
	Inhibition de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales par compétitions pour les récepteurs
<b>Augmentation des fonctions de barrières</b>	Stimulation de la production de mucus
	Augmentation de l'intégrité de la barrière intestinale (jonctions serrées)
<b>Immunomodulation</b>	Effets sur les cellules épithéliales intestinales
	Effets sur les cellules dendritiques
	Effets sur les monocytes/macrophages
	Effets sur les lymphocytes : Lymphocytes B Lymphocytes T Cellules NK



**Figure 8 .** Résumé schématique des mécanismes d'action des probiotiques (Villegier, 2014).

- (1) Activité antimicrobienne directe (sécrétion de bactériocines/défensines).
- (2) Inhibition des pathogènes par compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion à la muqueuse.
- (3) Augmentation des fonctions de barrière en stimulant la sécrétion des mucus, de peptides antimicrobiens et le maintien des jonctions serrées.
- (4) Activité antimicrobienne indirecte par diminution du pH luminal.
- (5) Immunomodulation de l'activité des cellules épithéliales et des cellules immunitaires.

### I.3.5 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs avantages pour la santé sont attribués à l'ingestion des probiotiques dont certains ont été prouvés scientifiquement et d'autres nécessitent encore des études plus approfondies chez l'homme (Bouguerra,2021).

#### I.3.5.1 Effets bénéfiques sur la santé animale

L'introduction des probiotiques dans l'alimentation animale a prouvé une efficacité commune chez de nombreux animaux, dans le maintien et le rééquilibrage de la flore intestinale (Mermouri, 2018). De nombreux probiotiques sont en effet utilisés dans l'alimentation animale dans le but de limiter l'utilisation d'antibiotiques et de maintenir leur bien-être, conduisant de ce fait à améliorer leur croissance donc leur prise de poids (Alard, 2017).

#### I.3.5.2 Effets bénéfiques sur la santé humaine

Les probiotiques ont des effets bénéfiques. Ces derniers peuvent être répartis en deux groupes : des effets bénéfiques sur l'équilibre de la microflore intestinale et des effets thérapeutiques. La figure 9 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé.

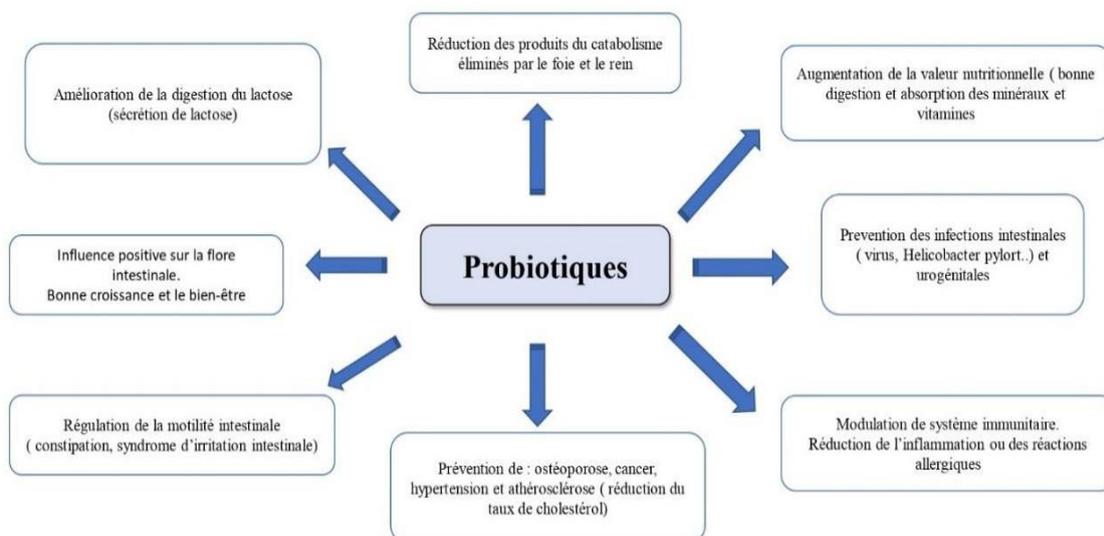


Figure 9 . Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Mercenier et al., 2003).

- **L'élimination ou diminution d'intolérance au lactose**

L'intolérance au lactose est provoquée par l'absence de synthèse de la lactase ou B-galactosidase par les cellules de la surface épithéliale de l'intestin. De ce fait, n'étant pas assimilé, le lactose est responsable de troubles intestinaux chez les personnes déficientes en cette enzyme. Les bactéries lactiques produisent la B-galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. L'utilisation des bactéries lactiques comme probiotique facilite la digestibilité du lactose chez les personnes atteintes d'intolérance (**Chemlal-Kheraz, 2013**).

- **Effets sur le système immunitaire**

Il a été établi que les bactéries lactiques étaient capables d'agir positivement sur le système immunitaire, affectant à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative, réduisant ainsi la colonisation par des agents pathogènes (**Saiz Vieco, 2019**).

- **Maladies allergiques**

Des études cliniques ont montré l'effet de la préparation *Enterogermina* sur la modulation de la réponse immunitaire chez des enfants allergiques souffrant d'infections respiratoires chroniques (**Villeger, 2014**).

- **Réduction de trouble associées au système gastro-intestinale**

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande évidence, sur la santé humaine, concerne leur rôle sur l'intestin par l'inhibition des germes pathogènes et la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (**Bahri,2014**).

La consommation de lactobacilles probiotiques peut changer la composition et l'activité métabolique de la flore intestinale par la production d'acides gras à chaînes courtes et de gaz. De plus, ils affectent la mobilité intestinale réduisant par cet effet les symptômes (**Belkeziz,2020**).

- **Diminutions du taux de cholestérol dans le sang**

L'habilité des lactobacilles à dégrader les acides biliaires participant à la synthèse du cholestérol, et confirme ainsi le rôle avantageux de ces ferments dans la régulation du métabolisme humain (**chemlal-Kheraz, 2013**).

- **Autre effets bénéfiques liées aux souches probiotiques**

Réduction du risque de **Hadef,2012**) :

- Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein).
- Coronaropathie, maladie des voies urinaires.
- Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes.

### **I.3.6 Applications des probiotique**

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (**Ezzariga, 2015**) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation.
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (**Ezzariga, 2015**).

La survie des probiotiques dans les produits est affectée par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation et de stockage. Les nouvelles technologies, comme la micro-encapsulation et la technologie des cellules immobilisées, offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires. Les fabricants commercialisent de nouveaux vecteurs d'administration de probiotiques comme des pailles et des capsules de bouteille qui, lorsque percées ou brisées, délivrent des doses thérapeutiques de probiotiques dans un produit alimentaire (**Tahlaiti, 2019**).

**CHAPITRE II**  
**MATERIEL ET METHODES**

Notre travail qui porte sur l'isolement et identification des bactéries lactiques a potentiel probiotique à partir de lait cru de chèvre, a été réalisé en deux parties. La première qui porte sur l'isolement et l'identification phénotypique, physiologique et biochimique des bactéries lactiques a été réalisée au sein du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida. La deuxième partie qui s'intéresse à l'étude et recherche des caractéristiques de ces bactéries lactiques à potentiel probiotique a été réalisée au niveau de deux laboratoires de contrôlé de qualité et de conformité « Bioqual et Altesse » sur une période allons de 05 avril jusqu'au 20 juin 2022).

## II.1 Matériel

### II.1.1 Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par l'appareillage, la verrerie, les produits chimiques et les milieux de culture est consigné en annexe IV.

### II.1.2 Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé du lait cru de chèvres provenant des fermes d'élevage situées dans la région de Soumaa Blida.

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons utilisé 5 souches pathogènes. Ces dernières ont été fournies par le laboratoire d'hygiène, Blida (**Tableau 4**).

**Tableau 4** : Caractéristiques des souches pathogènes

Souches pathogènes	Gram	Milieu sélectif	Code
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Gélose nutritive	ATCC 8139
<i>Staphylocoquus Aureus</i>	Gram +	Gélose nutritive	ATCC 6538
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Gram -	Gélose nutritive	ATCC 9027
<i>Bacillus Spizizenii</i>	Gram +	Gélose nutritive	ATCC 6655
<i>Klebsiella Pneumoiae</i>	Gram -	Gélose nutritive	/

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Echantillonnage

Les échantillons du lait cru de chèvre proviennent des fermes d'élevage situées dans la ville de Blida. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée puis séchage avec une lingette stérile du pis de la chèvre, le lait est recueilli dans des 3 flacons stériles (200 ml/flacon), puis acheminés stérilement le jour même dans une glacière jusqu'au laboratoire et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

### II.2.2 Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactique est réalisée sur milieu MRS pour but d'isolée les bactéries lactiques du genre *Pedicoque*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et sur milieux M17 pour but d'isolée les *Streptococcus thermophilus*.

- **Préparation des susceptions décimales :**

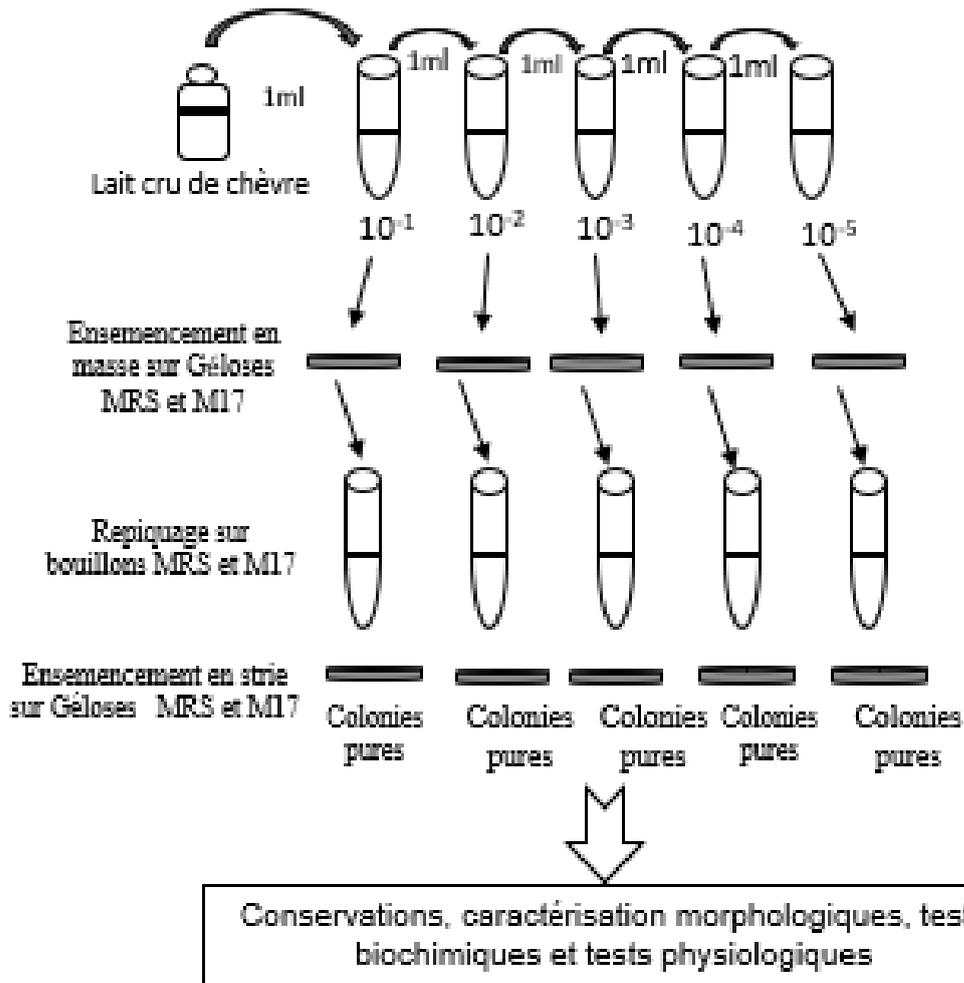
La susception est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution (**Begloul, 2012**). Cette solution ne doit pas induire de variations qualitatives ni quantitatives sur la flore microbienne présente. Il doit aussi assurer la survie de tous les microorganismes mais ne doit pas favoriser leur multiplication.

Après homogénéisation du lait de chèvre cru, une série de dilution a été effectué. À l'aide d'une pipette stérile 1 ml de notre échantillon est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique ; la dilution 1/10 ou  $10^{-1}$  est ainsi obtenue. L'opération été répété jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$  (**Terza hi et sanidine ,1975**).

Les ensemencements sont réalisés en utilisant les dilutions décimales obtenus à partir de l'échantillon initial (**De man et al.,1960**) (**Figure 10,11**).



**Figure 10** . Préparation des dilutions décimales (photographie originale)



**Figure 11.** Diagramme d'isolement des bactéries lactiques

- **Mise en culture**

La méthode consiste à verser à l'aide d'une pipette pasteur stérile un volume de 1 ml de dilution dans chaque boîte de pétri (1 boîte par dilution) puis inondée par le milieu en surfusion, en homogénéisant le milieu avec des mouvements en 8 afin de réaliser un ensemencement en masse.

Après solidification des milieux, les boîtes avec le milieu MRS sont incubées à 37° pendant 48-72h en anaérobiose pour l'isolement des *Lactobacillus*, *Enterococcus* et les *Pediococcus*. Les boîtes ensemencées sur milieu M17 sont incubées à 45° pendant 24-48h en aérobie pour l'isolement des Streptocoques lactiques (**Badis et al., 2005**).

### II.2.3 Purification des isolats

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur bouillon et gélose (M17 et MRS) (**Hicham,Lakehal 1998**). Quelques colonies bien isolées qui appartiennent aux dilutions préalablement réalisées ont été repiqués dans des tubes stériles contenant 3 ml de chaque bouillon. Les tubes sont incubés pendant 24h à 37°C pour les bouillons MRS et à 45°C pour les bouillons M17. L'apparition du trouble confirme une croissance bactérienne.

Les boîtes de pétri contenant la gélose préalablement coulée et solidifiée sont ensemencées à partir des tubes ayant montré une croissance bactérienne à l'aide d'une anse en platine et selon la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants). L'incubation a été faite pendant 48h à une température de 37°C pour les boîtes contenant le milieu MRS et de à 45°C pour les boîtes contenant milieu M17.

### II.2.4 Caractérisation et identification des bactéries lactiques

Après avoir obtenu des cultures homogènes, l'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques de la microbiologie classique, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (**Lairini et al.,2014**).

#### II.2.4.1 Etude morphologique

Cette étude est basée sur l'observation macroscopique et microscopique

##### A- Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, la taille, couleur et consistance) sur les milieux MRS et M17, dans le but d'écarter tout ce qui ne peut pas être des bactéries lactiques (**Belarbi, 2011**).

##### B- Examen microscopique

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologique et organisationnels de bactéries : coque ou bacilles, organisées en chaînettes ou isolés, bactéries Gram positif ou négatif (**Singleton,1999**). Ces caractères sont déterminés selon la méthode de coloration de Gram qui consiste à :

##### ➤ Préparation d'un frottis

Une goutte d'eau physiologique été déposé sr une lame propre. À l'aide d'une anse en platine une fraction d'une colonie isolée est étalée d'une façon mince et homogène pour obtenir un

frottis. Ce dernier a été séché à l'air libre puis fixé par 3 passages rapides et brefs de la lame au-dessus d'une flamme d'un Bec Bunsen (frottis situé sur le dessus).

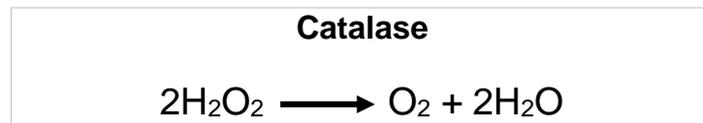
➤ **Étapes de la coloration différentielle de Gram**

Le frottis fixé est coloré pendant une minute au violet de gentiane. Il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'alcool 95%, il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et en fait couler le solvant sur le frottis pendant 10 secondes. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade les cellules gram (-) seront incolores, les cellules gram (+) violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration d'une minute à la fuchsine pour colorer les cellules gram (-). Après un bref rinçage, on sèche le frottis et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X100) (**Denis et al.,2011**).

### II.2.4.2 Examens physiologiques et biochimiques

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme respiratoire produite par les bactéries aérobies strictes ou facultatives. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) et en oxygène (O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante :



Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott et al., 2003**. Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu MRS et M17 gélosé à l'aide d'une anse stérile dans de l'eau oxygénée à 10 volumes préalablement déposer sur une lame. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

- **Test d'oxydase**

Ce test est un critère d'identification des bactéries lactiques. A l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie bactérienne est déposée sur un disque (9 mm) préimprégné du réactif N-diméthyle paraphénylène diamine. Après quelque instant, les bactéries produisant l'oxydase deviennent violettes (**Guiraud, 1998**). Les bactéries oxydases négatives sont retenues.

- **Test de croissance à différentes températures**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau *et al.*, 1991).

Des souches jeune de 18h sont ensemencer dans des tubes remplies de 5ml de bouillon M17 et MRS et incubé pendant 24 h aux températures à 22°C, 37°C et à 45°C, la croissance est appréciée par l'apparition de troubles (Guessas *et al.*, 2004).

- **Recherche du type fermentaire**

Les bactéries lactiques pendant leur croissance dégradent les sucres contenus dans le milieu de culture en empruntant soit la voie homofermentaire dont le produit final est essentiellement l'acide lactique ou hétérofermentaires qui produit en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO<sub>2</sub> (De Roissart et Luquet, 1994).

La recherche du type fermentaire permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. Des cultures jeunes sont cultivées dans des tubes contenant du 10 ml du bouillon MRS ou M17 contenant des cloches de Durham et incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Les bactéries hétérofermentaires se manifeste par l'apparition de bulles dans la cloche qui signifie la production de gaz (CO<sub>2</sub>) (Garvie, 1986).

- **Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Ce test permet de savoir si les bactéries sont capables de croître dans un milieu hypersalé. Les cultures sont ensemencées dans les boillons MRS et M17 à 3% (3g de NaCl par 100 ml de milieu), et 6,5% de NaCl. Les tubes contenant les milieux MRS sont incubés à 37°C pendant 24h. Les tubes contenant le boillon M17 sont incubés à 45 c°. La capacité à croître dans ces milieux hostiles est appréciée par une croissance dans les milieux de culture et par comparaison avec un tube témoin réalisé avec une culture dans du MRS et M17 sans NaCl. Les résultats positifs se traduisent par un trouble (Carr *et al.*, 2002).

### **II.2.4.3 Conservation des isolats**

Les souches sont conservées à long terme par congélation à -4°C sur bouillon MRS et M17 supplémentés de glycérol (glycérol stock). Une culture des souches à conserver est effectuée en utilisant un bouillon MRS et M17. Après croissance des bactérie, 30% de glycérol stérile est ajouté en raison de leur action protectrice est due au fait qu'ils empêchent les cristallisations dans les conditions du refroidissement avec 70% de la culture qui est ensuite répartie dans des Eppendorf (à raison de 1ml) et mise à la congélation

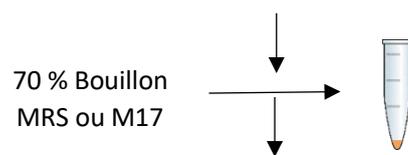
(Nancib,2007). Cette méthode est adaptée pour des conservations de l'ordre de plusieurs mois à une année (Saidi et *al*, 2002) (Figure 12).



(A)



Culture de 18h bouillon MRS



30 % de glycérol est ajouté au Bouillon, le tout dans des tubes d'Eppendorf



Conservation à  $-4^{\circ}\text{C}$

(B)

**Figure 12.** Conservation à long terme des isolats.

- (A) : conservation des isolats sur MRS ou M17 (photographie originale)  
(B) : schéma explicatif de la conservation à long terme

## II.2.5 Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

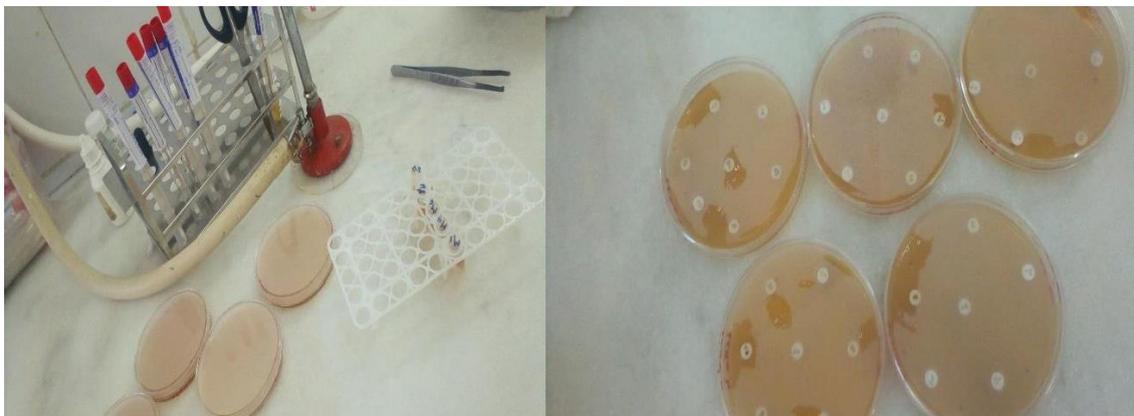
### II.2.5.1 la résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée. Chaque souche d'une culture jeune de 18 h d'incubation, estensemencée par écouvillonnage sur gélose (MRS / M17) déjà coulée et solidifiée. Chaque boîte reçoit six (6) disques d'antibiotiques à savoir : Amikacine, Erythromycine, Clindamycine, Chloramphénicol, Oxacilline, Gentamicine (**Tableau 5 ; Figure 13**). Après incubation à 37° pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Idoui et al., 2008**).

**Tableau 5 :** Disques d'antibiotiques utilisés

L'antibiotique	Abréviation	La charge en µg	Diamètres critiques (mm)	
			R	S
<b>Chloramphénicol</b>	C	30	≤12	≥18
<b>Amikacine</b>	AK	30	≤16	≥16
<b>Oxacilline</b>	OX	5	≤22	≥23
<b>Erythromycine</b>	E	15	≤12	≥15
<b>Clindamycine</b>	CD	2	≤14	≥21
<b>Gentamicine</b>	CN	10	≤12	≥15

R : résistant, S : sensible



**Figure 13.** Sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques

### II.2.5.2 Test de thermorésistante

La thermorésistance a pour but d'isoler ou identifier les souches résistantes à une température de 60°C. Les cultures bactériennes doivent être jeunes et pures et inoculées en milieux liquides (MRS ou M17). Les tubes sont introduits dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes. Il faut prendre garde de ne pas souiller les bords des tubes en inoculant et de refroidir rapidement les tubes après chauffage. Après refroidissement, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un trouble (De Roissart et al, 2006).

### II.2.5.3 Test de tolérance aux sels biliaires

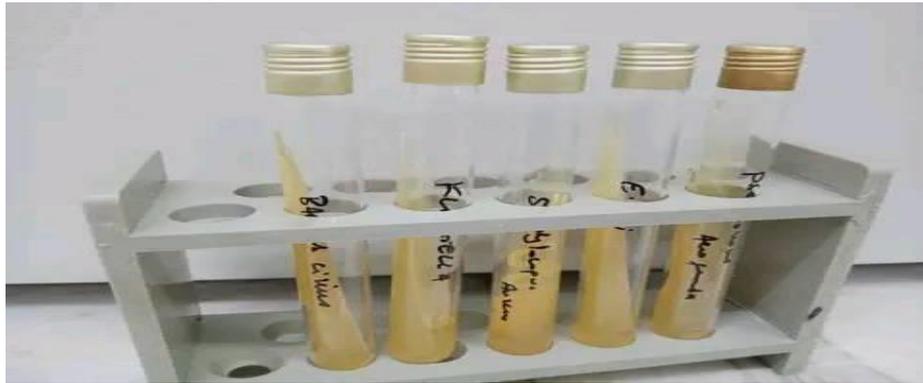
Les souches ayant montré une sensibilité aux antibiotiques ont été utilisées pour la réalisation de ce test. La technique rapportée par Lin et al. (2007) a été appliquée. Pour l'application de cette technique, 12 tubes pour chaque bouillon MRS et M17 ont été préalablement préparés. Dont 4 de chacun servira de témoin (T) et les 8 autres de chaque bouillon (16 tubes au totale) sont préparés à 0.3% et 1% de sels biliaires (SB). Les tubes préparés ont fait l'objet de la mesure de leur DO à 620nm à T=0h et après T=4h d'incubation à 37°C.

### II.2.5.4 Test d'activité antimicrobienne

Cette partie de notre étude est consacrée à tester l'activité inhibitrice de tous nos isolats lactiques isolés contre des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif. Ce test a été mis en évidence par deux méthodes :

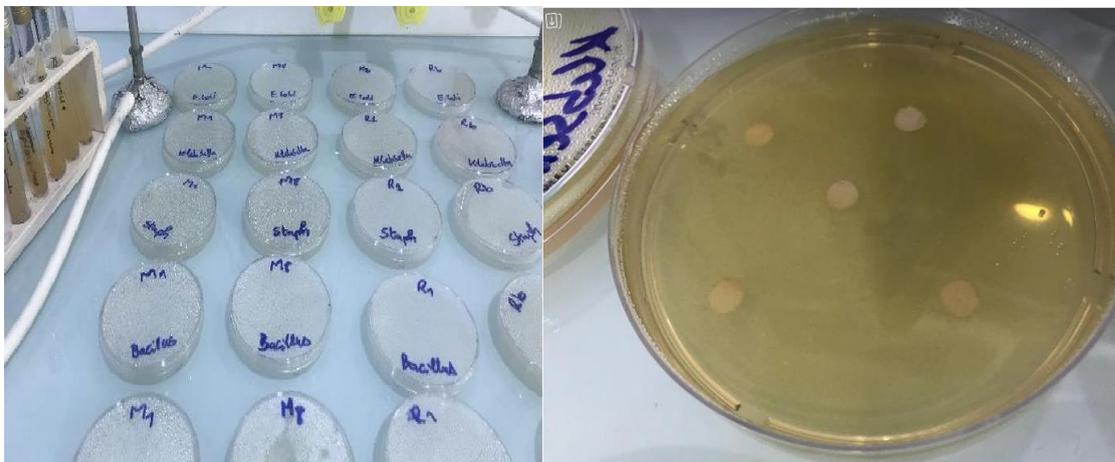
#### a. Méthode directe de double couche

Le test a été réalisé selon la méthode de Fleming et al., (1975). La gélose Mueller Hinton a été solidifiée dans les boîtes de pétrie et à l'aide des écouvillons stériles, un ensemencement en strie a été effectué avec cinq bactéries pathogènes de référence (*Pseudomonas aeruginosa* ATTC 6655, *Staphylococcus aureus* ATCC 9027, *Bacillus spizizenii* ATCC 6655, *Escherichia. Coli* ATCC 8139 et *klebsiella pneunoniae*) (Figure 14).



**Figure 14.** Les souches pathogènes ensemencées sur gélose inclinée.

Un volume de 10 µl des isolats préalablement cultivés sur bouillon MRS / M17 et incubé pendant 18H à 37°C a été déposé à l'aide d'une micropipette sur des disques vierge stériles (6mm de diamètre). A l'aide d'une pince stérile, ces disques ont été déposés sur les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les souches pathogènes. Les boîtes sont laissées sécher. Après le séchage, on coule le milieu MRS et M17 conformément à la méthode de la double couche (**Figure 15**).



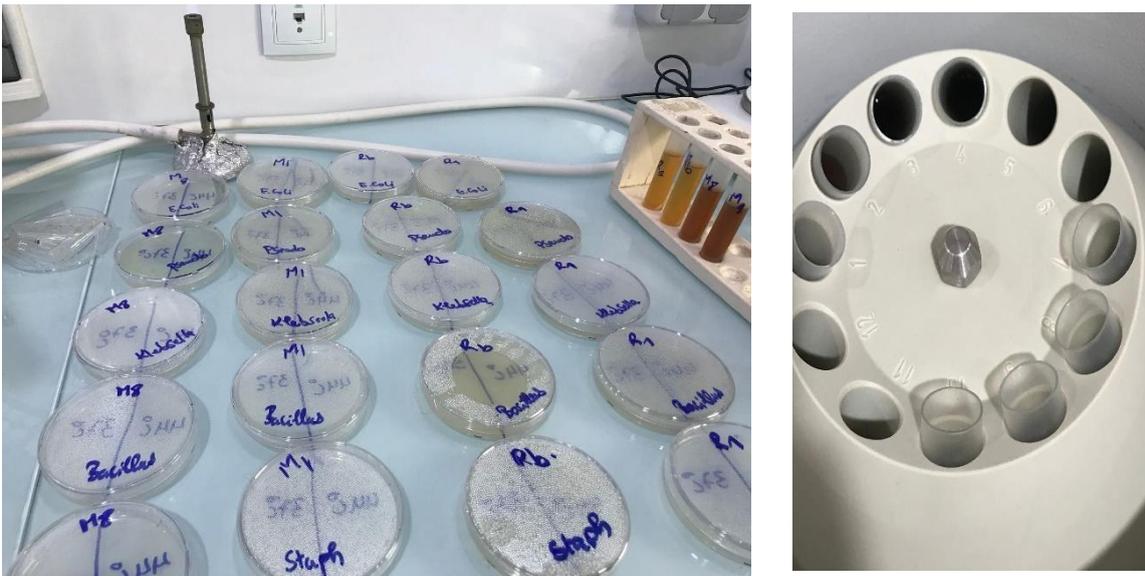
**Figure 15.** Teste de l'activité antimicrobienne (la méthode de doubles couches).

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose. Les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

## b. Méthode indirect des puits

La méthode des puits est celle décrite par Barefoot et Klaenhammer (1983). Elle permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de la substance antimicrobienne avec les souches pathogènes dans un milieu solide.

Des cultures lactiques ont été incubées sur milieu liquide MRS et M17 à 37°C et 44°C pendant 18h. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 4000rpm/10min (**Figure 16**).



**Figure 16 .** Teste de l'activité antimicrobienne la méthode des puits.

Des boîtes de Pétri sont ensemencées à l'aide des écouvillons stériles avec des bactéries pathogènes dans du milieu MH solide. Après solidification, des puits de 5mm de diamètre sont creusés, remplis par des surnageants de culture à tester et incubées à 37°C pendant 24h.

L'effet des surnageants se traduit par la formation des halos clairs autour des puits. La lecture des résultats est effectuée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions selon la formule :

$$\text{Diamètre d'inhibition} = \text{somme des diamètres perpendiculaires} - \text{le diamètre de puits.}$$

### II.2.5.5 Tolérance aux acides

Le test de tolérance aux acides a été réalisé en utilisant la technique décrite par Hydrominus *et al.* (2000) et Ding et Shah (2009).

Avant de réaliser ce test, les souches bactériennes testées ont été cultivées dans le bouillon MRS et M17 à 37 °C pendant 6h. 70µl des cultures bactériennes jeunes (de 6h) sont inoculées dans 7ml du bouillon MRS et M17 ajusté à différentes valeurs du pH (pH 2, pH 4 et pH 6.5) par du HCl.

Le résultat de la croissance bactérienne est obtenu par la détermination de la densité optique (DO 620 nm) après 6 et 24h d'incubation à 37 °C (**Sieladie *et al.* 2011**).

# **Chapitre III**

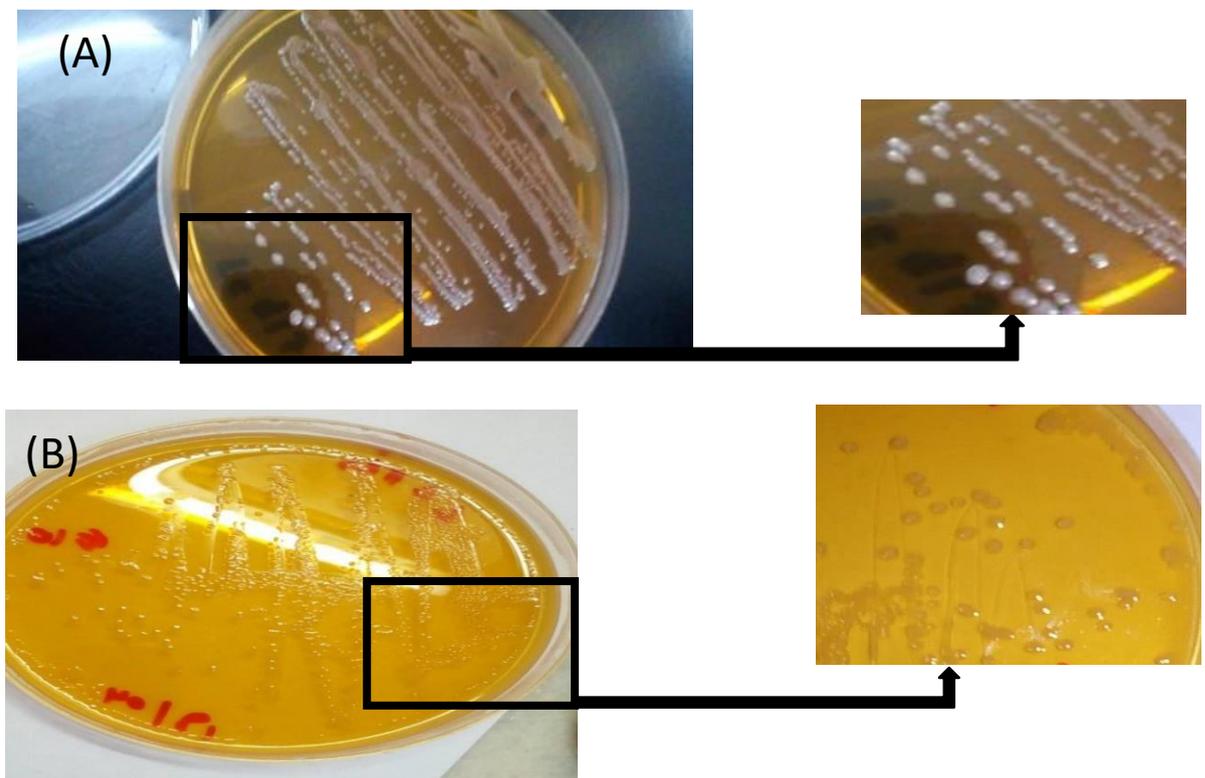
## **Résultats et discussion**

### III.1 Résultats

#### III.1.1 Etude morphologique

La morphologie des bactéries lactiques est un caractère important pour leur identification dont les dimensions, le contour, la couleur, la viscosité, la pigmentation, l'opacité sont des caractères précieux qui permettent une première approche vers l'identification (Laursen *et al.*, 2006). Après la purification, 10 isolats sur milieux MRS et 10 sur milieux M17 ont subi un examen macroscopique et microscopique.

Les résultats de l'examen macroscopique des isolats lactiques cultivés sur milieux solide MRS et M17 tels que la forme, la taille et le contour sont illustrés par la figure 17 et résumé dans le tableau 6.



**Figure 17.** Observation macroscopique des colonies des souches cultivées.

(A) Observation sur gélose M17 ; (B) Observation sur gélose MRS.

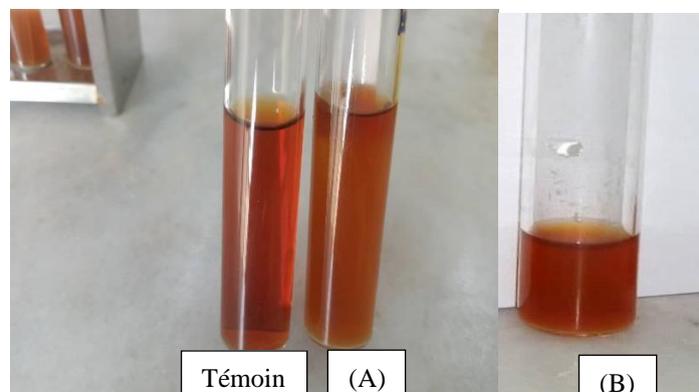
**Tableau 6 : Résultats des tests macroscopiques**

Les souches	Forme	Taille	Couleur
LCMR1	Circulaire	2 mm	Blanchâtre
LCMR2	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCMR3	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCMR4	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCMR5	Circulaire	1.5 mm	Blanchâtre
LCMR6	Circulaire	2 mm	Blanchâtre
LCMR7	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCMR8	Circulaire	0.5 mm	Blanchâtre
LCMR9	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCMR10	Circulaire	1.5 mm	Blanchâtre
LCM1	Circulaire	1.2 mm	Blanchâtre
LCM2	Circulaire	1.5 mm	Blanchâtre
LCM3	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCM4	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCM5	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCM6	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCM7	Circulaire	0.8 mm	Blanchâtre
LCM8	Circulaire	1.5 mm	Blanchâtre
LCM9	Circulaire	1 mm	Blanchâtre
LCM10	Circulaire	2 mm	Blanchâtre

Code LCMR : représente les souches ensemencées sur gélose MRS.

Code LCM : représente les souches ensemencées sur gélose M17.

L'observation macroscopique des cultures en milieux liquide a permis de constater que tous les isolats possèdent un trouble homogène indiquant une bonne croissance après 24h d'incubation (**Figure 18**).

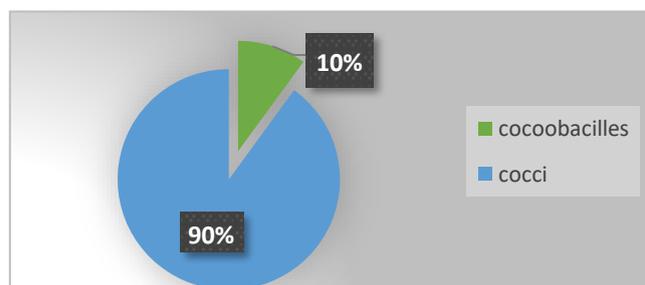


**Figure 18.** Cultures des souches sur milieu MRS (A) ou M17 (B) après 24h d'incubation.

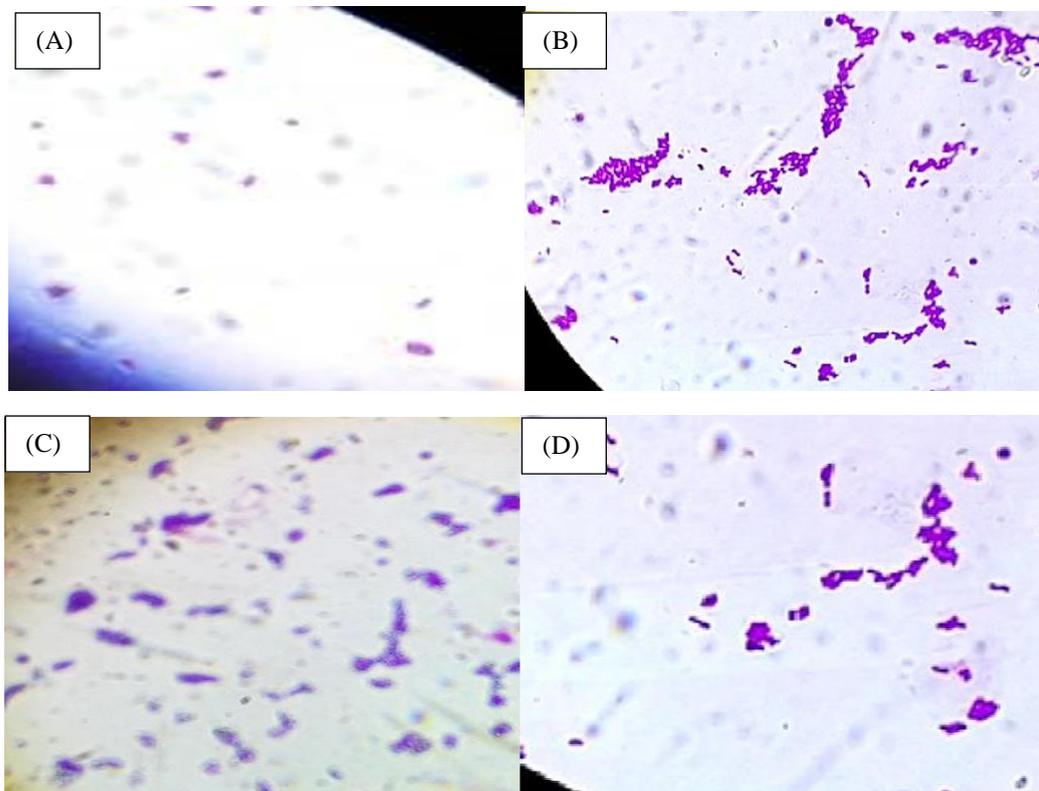
• **Résultats de l'examen microscopique**

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique (GX100) en utilisant l'huile à immersion. Toutes les bactéries étudiées se sont révélées Gram + (100%), de forme coques et sont disposées, en paire, groupées en amas et parfois en courtes chaînes. Ces colonies se sont distinguées par deux formes (figure 20 ,21 et le tableau 8) :

- 10% présentent une forme coccobacilles isolées, en amas, en tétrade et aussi en chaîne.
- 90% des isolats ont une forme cocci disposés en tétrade, en paire, groupés en amas et parfois en courtes chaînes.



**Figure 19 .** Les proportions des bactéries lactiques isolées.



**Figure 20 .** Observation microscopique (GX100)

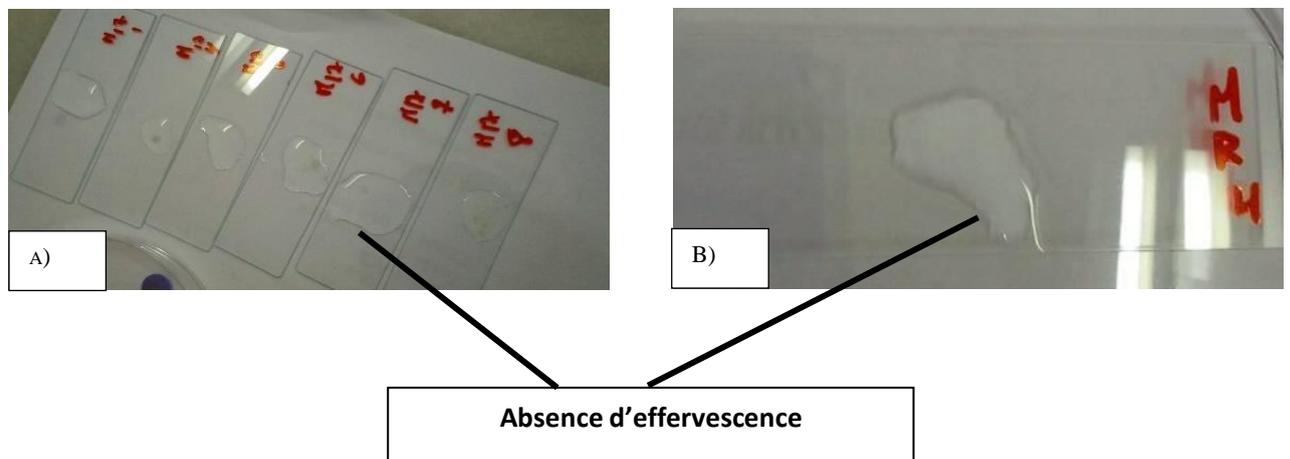
A, B : Observation microscopique des isolats lactiques sur gélose MRS.  
 C, D : Observation microscopique des isolats lactiques sur gélose M17.

### III.1.2 Résultat d'examens physiologiques et biochimiques

- **Test de catalase**

Le test de catalase a révélé que les souches sont catalase négative. Toutes les souches étudiées ne représentaient pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 22**). Ce résultat reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène. La majorité des bactéries lactiques sont des anaérobies facultatifs et n'ont pas besoin de synthétiser la peroxydase (**Larpent, 1997**).

Ces caractéristiques (Gram+, catalase -) permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques (**Belyagoubi, 2014 ; Kassas, 2017**).



**Figure 21 .** Résultat de teste catalase.

A : résultat négative du test catalase sur gélose M17.  
 B : résultat négative du test catalase négative sur gélose MRS.

- **Teste oxydase**

Tous les isolats ont montré une absence de la coloration violette meme après quelques secondes, ce qui révèle un résultat d'oxydase négatif. (**Figure 22**)

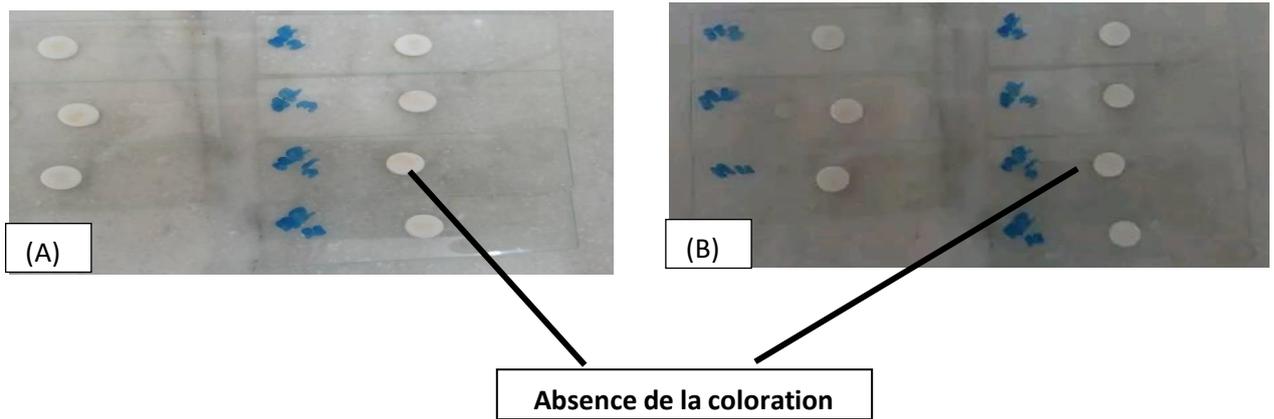


Figure 22 . Résultat de teste oxydase.

A : résultat négative du teste catalase sur gélose MRS.

B : résultat négative du teste catalase négative sur gélose M17.

Tableau 7 : Résultats des caractéristiques microscopique et biochimiques.

Les souches	Forme	Arrangement	Catalase	Oxydase	Gram
LCMR1	Cocci	Isolées, En chaine en tétrade	-	-	+
LCMR2	Cocci	En chaine en tétrade	-	-	+
LCMR3	Coccobacille	En courte chaine isoler	-	-	+
LCMR4	Cocci	Isolées, En chaine en tétrade	-	-	+
LCMR5	Cocci	En chaine, en diplocoques	-	-	+
LCMR6	Cocci	En chaine en tétrade	-	-	+
LCMR7	Coccobacille	En amas	-	-	+
LCMR8	Cocci	En chaine, en tétrade	-	-	+
LCMR9	Cocci	En chaine, isolées	-	-	+
LCMR10	Cocci	En chaine en tétrade	-	-	+
LCM1	Cocci	Isolées	-	-	+
LCM2	Cocci	En diplocoques	-	-	+
LCM3	Cocci	Isolées, En chaine en tétrade	-	-	+
LCM4	Cocci	En amas	-	-	+
LCM5	Cocci	En courte chaine isoler	-	-	+
LCM6	Cocci	En diplocoques	-	-	+
LCM7	Cocci	En amas	-	-	+
LCM8	Cocci	En chaine, en tétrade	-	-	+
LCM9	Cocci	En tétrade	-	-	+
LCM10	Cocci	En chaine, en diplocoques	-	-	+

+ : Résultats positive

- : Résultats négative

Le tableau 8 résume les résultats des caractéristique microscopique et biochimique de nos isolats étudier. La majorité des souches ont été de forme cocci, sauf LCMR3 et LCMR7 des coccobacilles. Toutes les souches ont été de Gram+, catalase et oxydase -.

- **Croissance en différentes températures**

Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile (Carr et al., 2002). Après incubation à 22°C, 30°C et à 45 °C, la plupart des souches sont thermophiles où nous observons une croissance sur le bouillon MRS et M17 après 24h d'incubation. Cependant seulement 1 souche (LCM6) parmi les 20 souches n'a pas montré une croissance sur les trois températures (Figure 23, Tableau 9).



Figure 23. Résultat de croissances des souches lactique dans différent température.

- **Résultat du type fermentaire**

Les résultats de ce test ont montré que toutes les souches testées ne produisent pas de CO<sub>2</sub> par la fermentation du glucose. Les résultats obtenus indiquent que toutes les souches sont des bactéries lactiques homofermentaires (Figure 24).

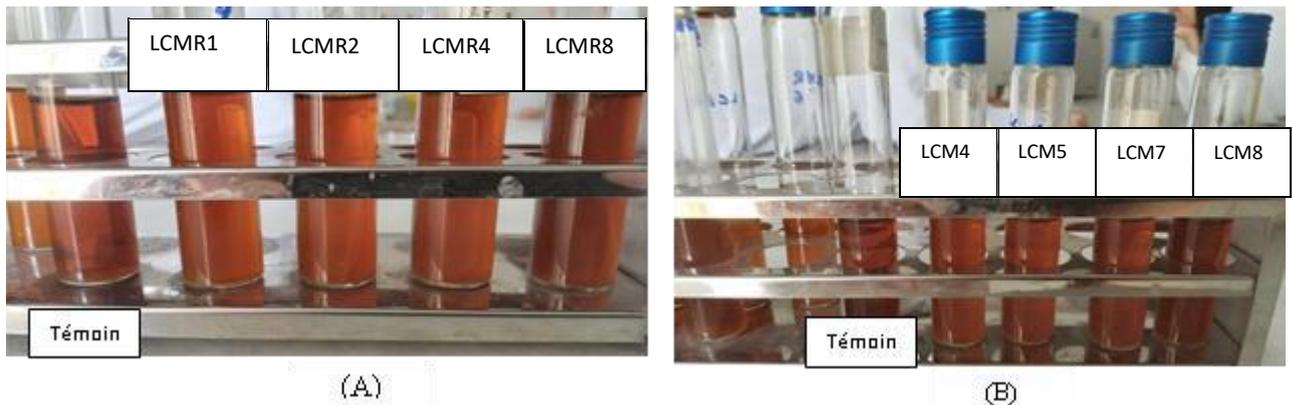


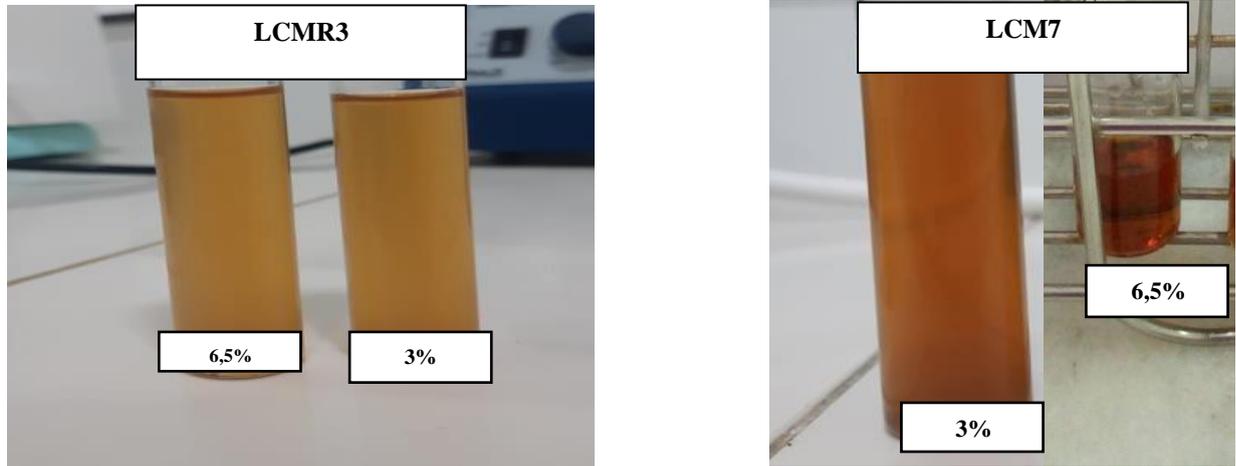
Figure 24. Résultat de type fermentaire

A : souches lactiques dans le bouillon MRS (LCMR1, LCMR2, LCMR4, LCMR8).

B : souches lactiques dans le bouillon M17 (LCM4, LCM5, LCM8, LCM7).

• **Résultat de la Croissance à différentes concentrations de NaCl.**

Ce test a révélé que toutes les souches cultivées sur milieu MRS sont capables de résister à des concentrations 3% et 6,5% de NaCl, à l'exception des souches cultivé sur M17 qui sont sensibles à 6.5%. **(Figure 25 et Tableau 9)**



**Figure 25 .** Résultats de la croissance de NaCl à deux concentration 3% et 6.5%.

**Tableau 8 :** Caractérisation physiologique des isolats lactiques.

Isolats	Températures °C			Concentration de NaCl (%)		Type fermentaire
	22	30	45	3	6.5	
LCMR1	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR2	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR3	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR4	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR5	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR6	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR7	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR8	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR9	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCMR10	+	+	+	+	+	Homofermentaire
LCM1	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM2	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM3	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM4	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM5	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM6	-	-	-	+		
LCM7	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM8	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM9	+	+	+	+	-	Homofermentaire
LCM10	+	+	+	+	-	Homofermentaire

+ : Résultats positive

- : Résultats négative

Globalement, les caractères phénotypiques (macro-microscopique, physiologiques et biochimiques) ont certifié de citer une hypothèse que les souches lactiques isolés sur milieu MRS appartiennent au genre *Pediocoque* et que les souches isolées sur milieu M17 représente le genre *Streprocoques*.

### III.1.3 Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

- **Résultat de l'antibiogramme**

Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques à travers les diamètres des zones inhibitrices émergentes après 24h d'incubation sont groupés dans les Tableau 10.

**Tableau 9** : Résultats de l'antibiogramme des isolats lactique.

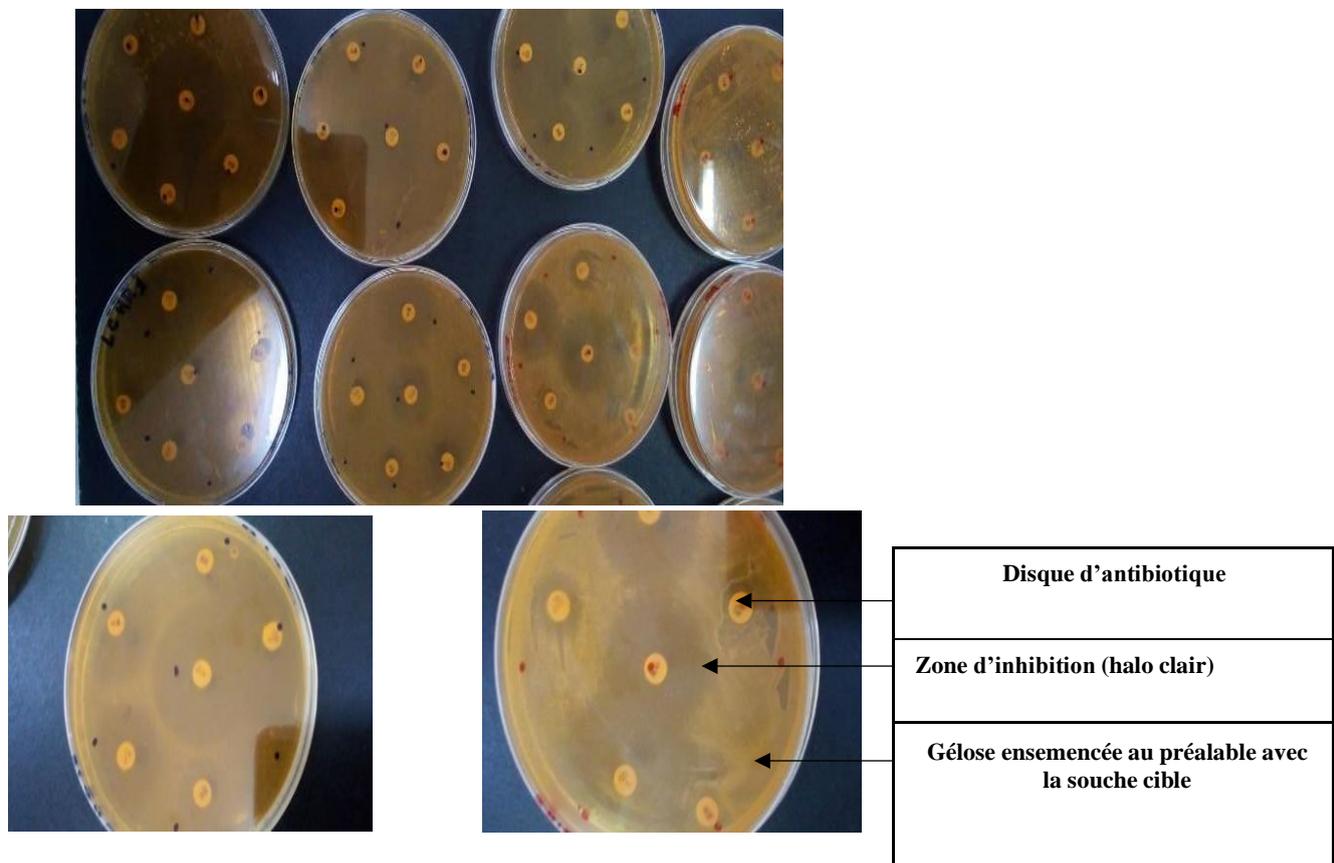
Les souches	E	CD	Ak	C	Ox	CN10
LCMR1	S	I	I	S	I	S
LCMR2	I	I	S	S	S	S
LCMR3	S	I	S	S	S	S
LCMR4	S	-	I	S	S	S
LCMR5	S	I	S	S	S	S
LCMR6	-	-	S	S	S	S
LCMR7	S	I	S	S	S	S
LCMR8	S	I	S	S	S	S
LCMR9	S	I	S	S	I	S
LCMR10	S	I	-	S	S	S
LCM1	S	S	I	R	S	S
LCM2	S	S	I	R	I	S
LCM3	S	S	I	R	S	S
LCM4	S	S	I	R	S	S
LCM5	S	S	I	R	S	S
LCM7	S	S	I	R	-	S
LCM8	S	S	I	R	S	S
LCM9	S	S	-	R	I	S
LCM10	S	S	-	R	-	S

E : Erythromycine, CD : Clindamycine, AK : Amikacine, C : Chloramphenicol, Ox : Oxacilline, CN10 : Gentamicine.

L'activité a été évaluée comme étant sensible, S (2-21 mm) ; intermédiaire, I (16-20 mm) et résistant, R ( $\leq 15$  mm). Les diamètres critiques sont définis pour chaque antibiotique par le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (Liasi *et al.* 2009).

Les résultats ont révélé des zones d'inhibition presque similaires pour toutes les souches. Les souches se sont révélées sensibles à 5 antibiotiques testées pour les souches ensemencées sur gélose MRS et sensibles à 4 antibiotiques pour les souches ensemencées sur gélose M17.

Cependant une résistance a été notée par les toutes souches isolées sur milieu M17 (LCM1, LCM2, LCM3, LCM4, LCM5, LCM7, LCM8, LCM9, LCM10) contre l'Amikacine. Les résultats sont représentés également par la figure 26.



**Figure 26 .** Résultat de la sensibilité de *Streptococcus thermophilus* aux antibiotiques

• **Résultats de la thermorésistance**

L'exposition des isolats sur bouillon MRS et M17 à une température de 60°C pendant 30 min permet de révéler que tous les isolats ont résisté à cette température à l'exception de LCM6. (Figure 27)

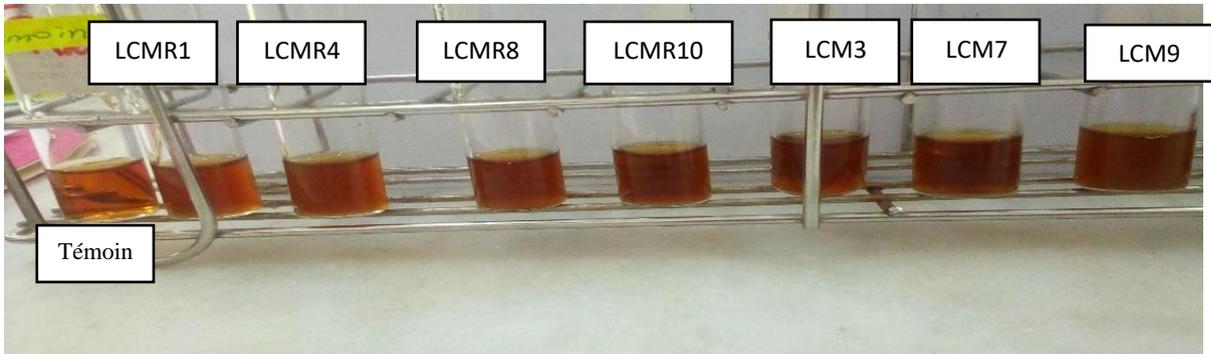


Figure 27. La croissance des souches isolées thermorésistantes

• **Résultat de tolérance aux sels biliaires**

D'après les résultats obtenus (Figure27), on constate que toutes les souches montrent une viabilité élevée en présence de toutes les concentrations testées en sels biliaires (0.3%, 1%) (Figure 28).

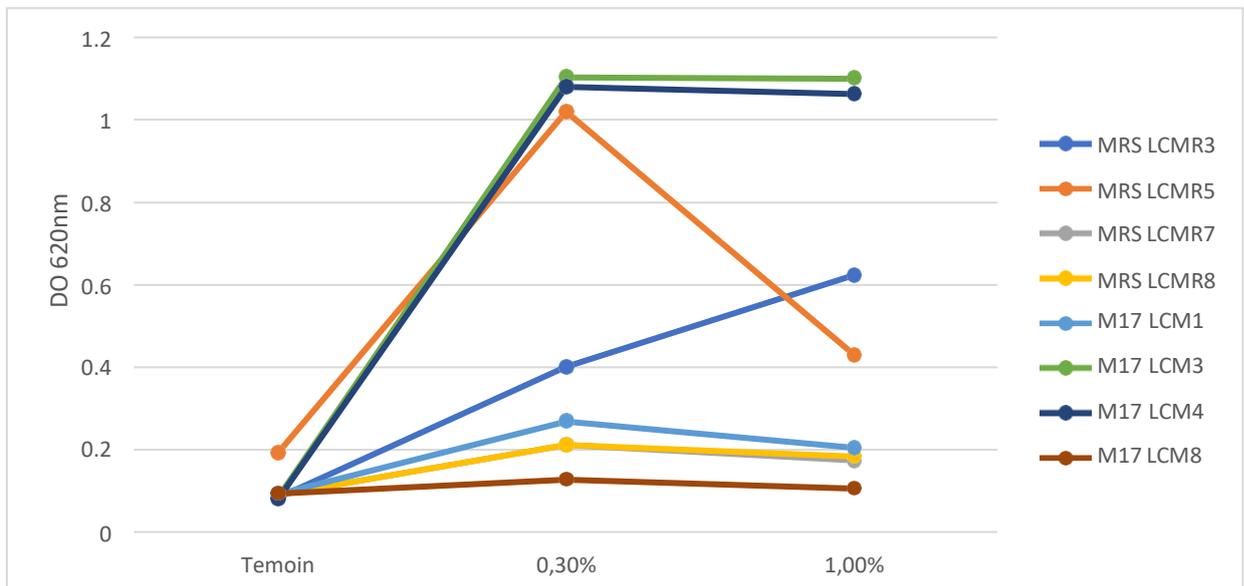


Figure 28 . Données de tolérance aux sels biliaires de certains isolats lactiques.

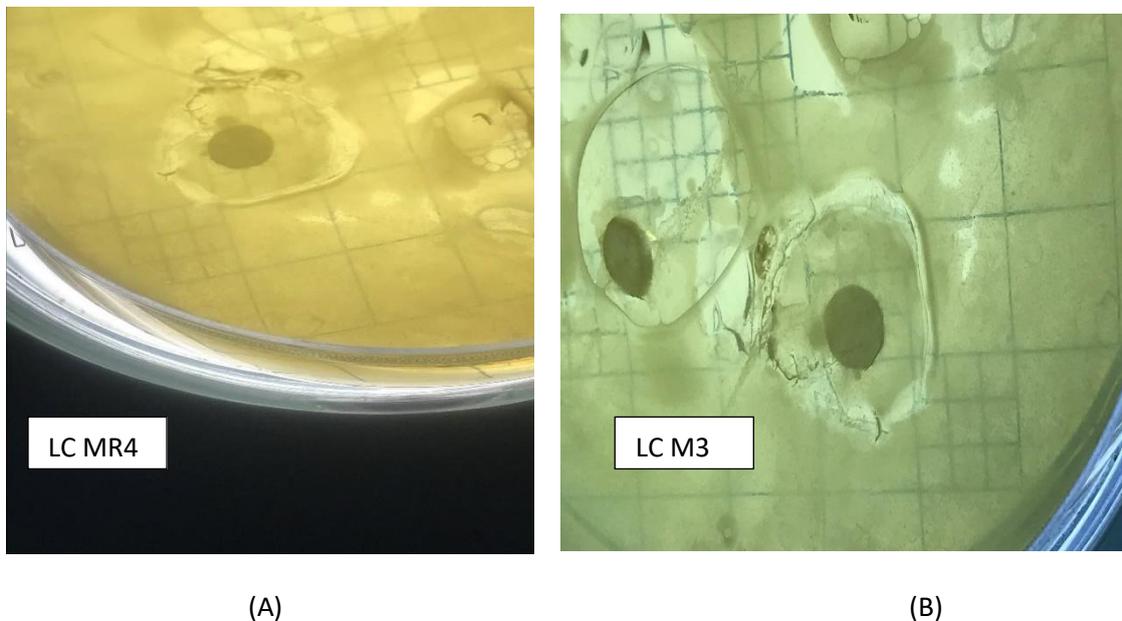
• **Résultats de l'activité antibactérienne**

**a. Méthode directe de double couche**

Afin de déterminer le spectre de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, nous avons réalisé le test de confrontation direct préconisé par Fleming et *al.*, (1975) vis-à-vis de deux souches pathogènes à Gram positif (*Staphylocoque Aureus* et *Bacillus Spizizenii*) et trois souches à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* et *Klebsiella Pneumoiae*). Cette méthode permet d'évaluer l'effet antagoniste par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Chacune des bactéries de nos échantillons a été testée comme inhibitrice (souches lactique) et indicatrice (souches pathogènes).

Les résultats des interactions bactériennes par la méthode directe entre les souches inhibitrices et les souches pathogènes témoignent que toutes les souches lactiques possèdent la capacité d'inhiber la croissance des souches pathogènes représenté par des zones claires avec bordures bien distinctes avec des diamètres qui varie en fonction de la bactérie pathogène et de la bactérie lactique.

Les diamètres varient entre 2 et 20mm. Selon Cardinal et *al.* (1977) et Tahiri (2007), les inhibitions dont les diamètres sont  $\geq 10$ mm sont considérées comme ayant un effet inhibiteur élevé. **(Figure 29)**



**Figure 29** : résultat de l'effet antimicrobien par méthode directe des souches testées .

(A) : inhibition d'isolat LC MR4 par *Escherichia coli*

(B) : inhibition d'isolat LC M3 par *Pseudomonas Aeruginosa*

La mesure de spectre d'inhibition démontre que les souches sélectionnées ont un pouvoir d'inhibition jusqu'à 83%, le diamètre d'inhibition varie vis-à-vis les souches pathogènes dont le taux des inhibitions exercées par les bactéries lactiques contre *Escherichia coli* et *Bacillus Spizizenii* est de 100%, 85% contre *Pseudomonas Aeruginosa*, alors que contre *Staphylocoque Aureus* et *Klebsiella Pneumoiae* est de 65%. (Figures 30,31)

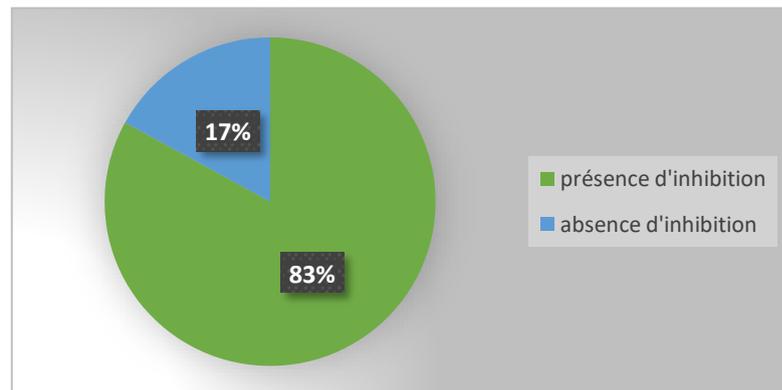


Figure 30 . Pourcentage d'inhibitions des bactérie lactiques.

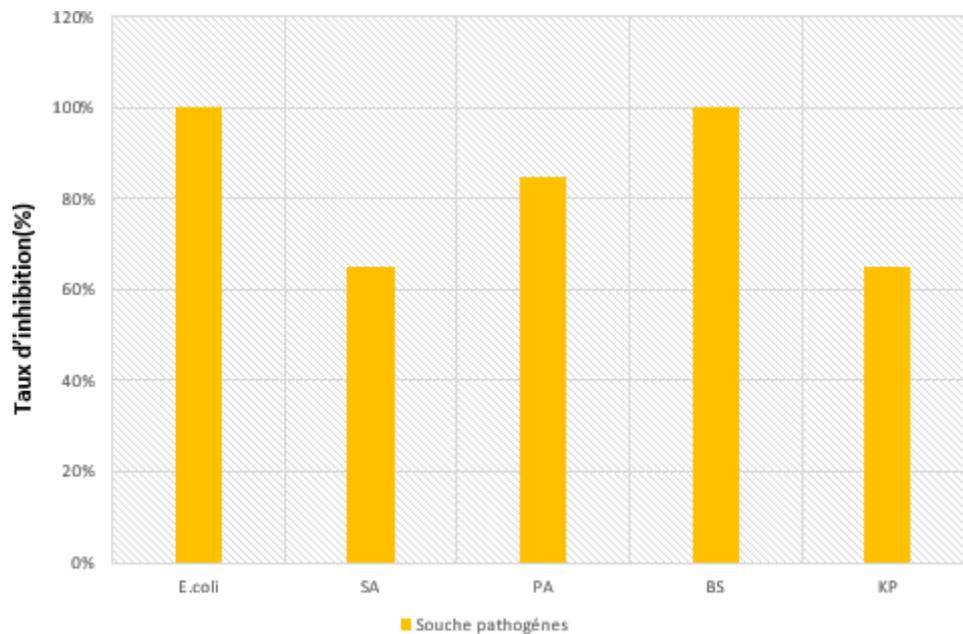
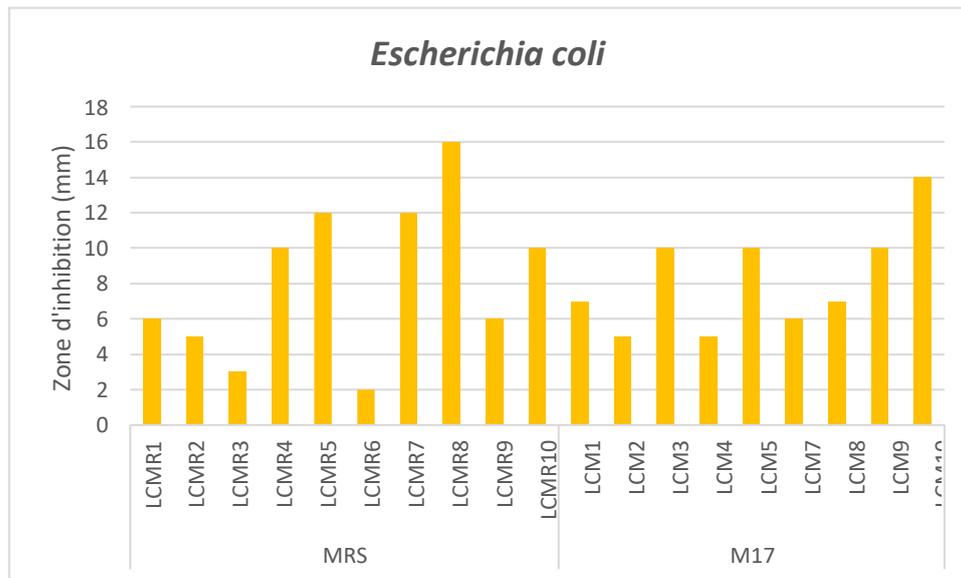


Figure 31 . Taux d'inhibitions des bactéries lactiques contre les souches pathogènes.

*E. coli* : *Escherichia coli* ; *SA* : *Staphylocoque Aureus* ; *PA* : *Pseudomonas Aeruginosa* ;  
*BS* : *Bacillus Spizizenii* ; *KP* : *Klebsiella Pneumoia*

### 1. Vis-à-vis *E. coli*

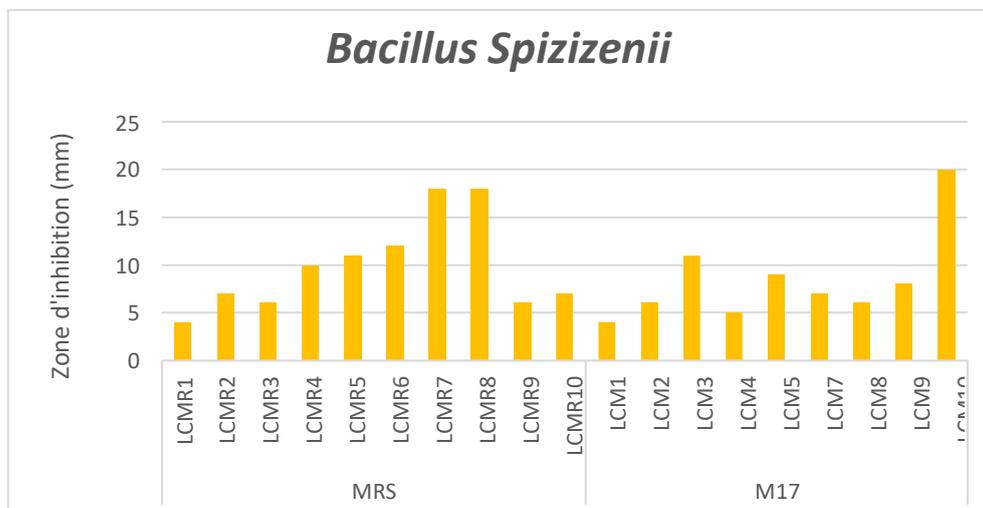


**Figure 32.** Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis *E. coli*.

La figure 32 montre une inhibition considérable de la souche d’*E. coli* par la majorité des souches lactiques avec des diamètres d’inhibition varient entre 6 à 16 mm pour les souches sur milieu MRS et 6 à 14 mm sur milieu M17.

D’après les résultats, les souches LCMR2, LCMR3, LCMR4, LCMR5, LCMR6, LCMR7, LCMR8, LCMR10 et les souches LCM1, LCM2, LCM3, LCM5, LCM4, LCM8, LCM9, LCM10 ont manifesté un spectre d’activité antibactérienne plus important avec des diamètres  $\geq 10$  mm.

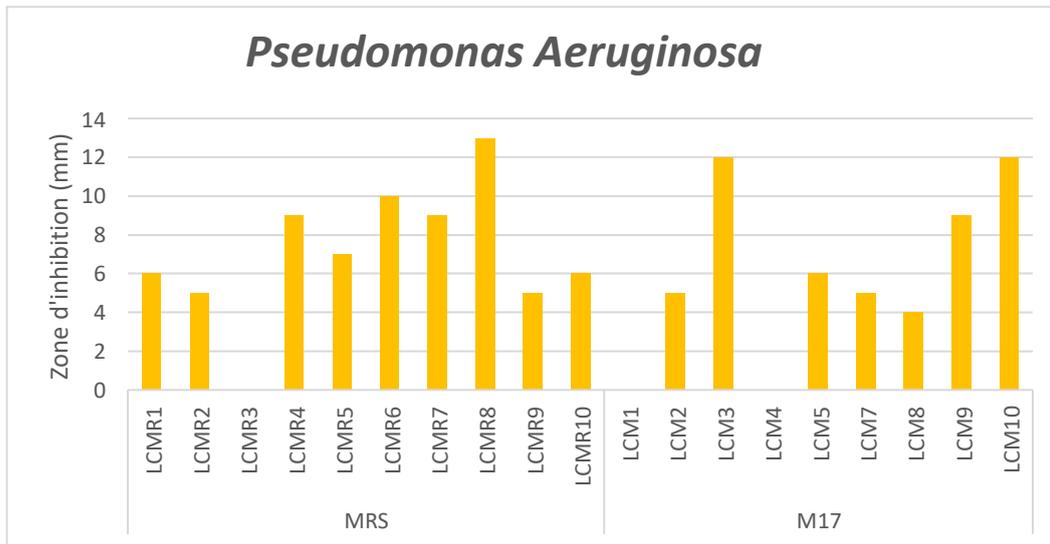
### 2. Vis-à-vis *Bacillus Spizizenii*



**Figure 33.** Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis *Bacillus Spizizenii*.

D'après les résultats des zones d'inhibition, nous remarquons que la souche de *Bacillus Spizizenii* a été inhibée par les 20 isolats lactiques avec un diamètre de zone d'inhibition varie entre 4 à 20 mm. LCMR7, LCMR8 ont la meilleure activité antibactérienne sur MRS avec un diamètre de 18 mm et LCM10 sur M17 avec un diamètre de 20 mm (Figure33).

### 3. Vis-à-vis *Pseudomonas Aeruginosa*

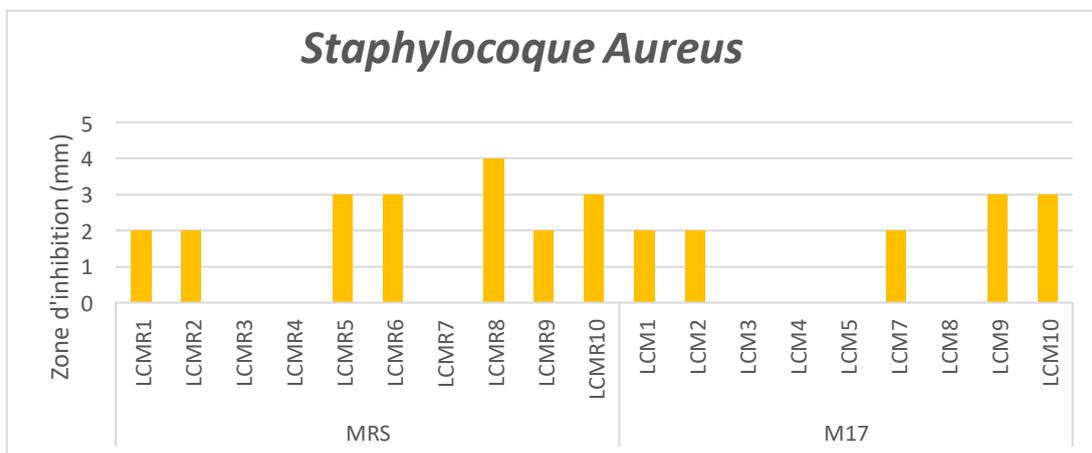


**Figure 34.** Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis *Pseudomonas Aeruginosa*.

Selon la figure 34, nous remarquons qu'il y a une variabilité dans l'activité antibactérienne des souches étudiées.

On note que les souches LCMR8, LCM3 présentent un spectre d'activité antibactérienne plus important avec des zones d'inhibition dans l'ordre 13, 12 mm par comparativement aux souches LCMR3, LCM4, LCM7 qui ne présentent aucune zone d'inhibition.

### 4. Vis-à-vis *Staphylocoque Aureus*

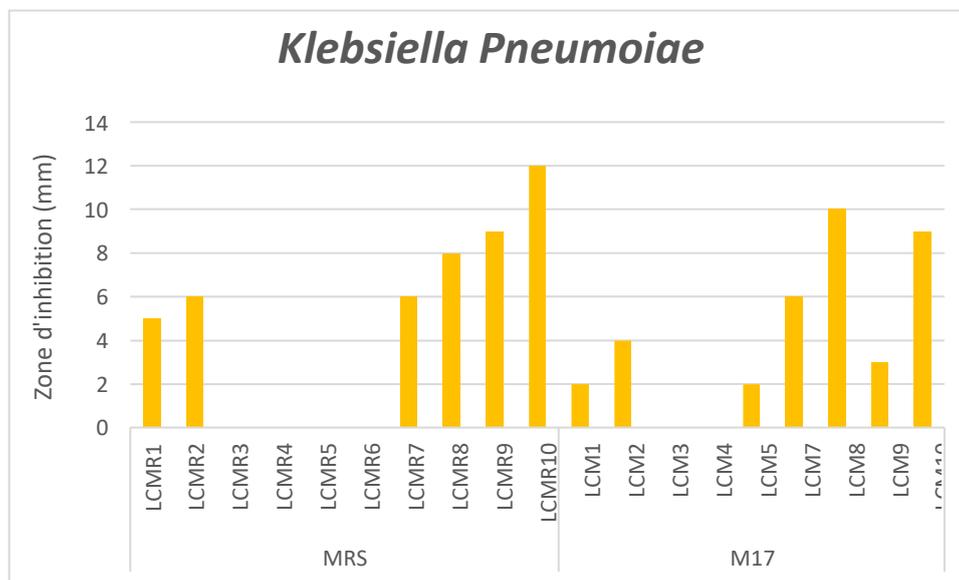


**Figure 35.** Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis *Staphylocoque Aureus*.

D'après les résultats des zones d'inhibition obtenus dans la figure 35, nous remarquons que les isolats lactiques n'ont pas un spectre d'activité antimicrobien important contre la souche de *Staphylocoque Aureus*.

Les souches LCMR3, LCMR4, LCMR7, LCM3, LCM4, LCM5, LCM8 ne présente aucune zone d'inhibition comparant aux souches LCMR1, LCMR2, LCMR5, LCMR6, LCMR9, LCM1, LCM2, LCM7, LCM9 dont les diamètres des zones d'inhibitions sont faibles et varient entre 2 à 4 mm.

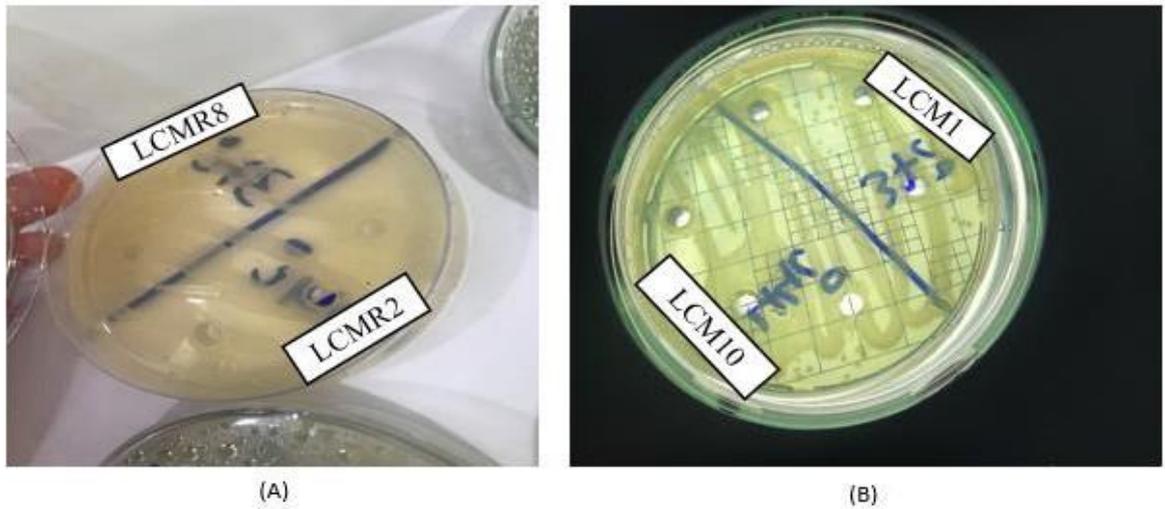
### 5. Vis-à-vis *Klebsiella Pneumoniae*



**Figure 36 .** *Activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis Klebsiella Pneumoniae*

La figure 36 montre que 35 % des isolats lactiques ne présentent aucune inhibition contre *Klebsiella Pneumoniae* et que LCMR10 et LCM8 ont un spectre d'activité antibactérien plus important que les autres souches avec respectivement des diamètres de 12 mm et 10 mm.

## b. Méthode indirecte des puits



**Figure 37 .** Inhibition obtenue par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) par les souches lactiques (LCMR8, LCMR2, LCM1, LCM10) vis-à-vis *E. coli* (A) et *Staphylocoque Aureus* (B).

Les isolats pré-identifiés ont été testés par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983), pour la détection de souches lactiques productrices de substances protéiques antimicrobiennes. Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des isolats avec les souches pathogènes indicatrices. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

Les résultats enregistrés ont permis de constater une absence totale des zones d'inhibitions autour des puits malgré de nombreuses répétitions (Figure 37).

- **Résultat de la tolérance aux acides**

Les souches de bactéries lactiques à potentiel probiotique ont été examinées pour leur habilité à tolérer de forte concentration en acide dans des bouillons MRS et M17 ajustés à des pH 2 ;4 et 6,5. Les résultats en été obtenu en calculent la densité optique après 6h et 24h d'incubation.

La survie à pH 6.5 était favorable pour toutes les souches de bactéries lactiques sélectionnées. Tous les isolats ont démontré une viabilité à pH 4, ont continué leur surcroissance à pH 2.

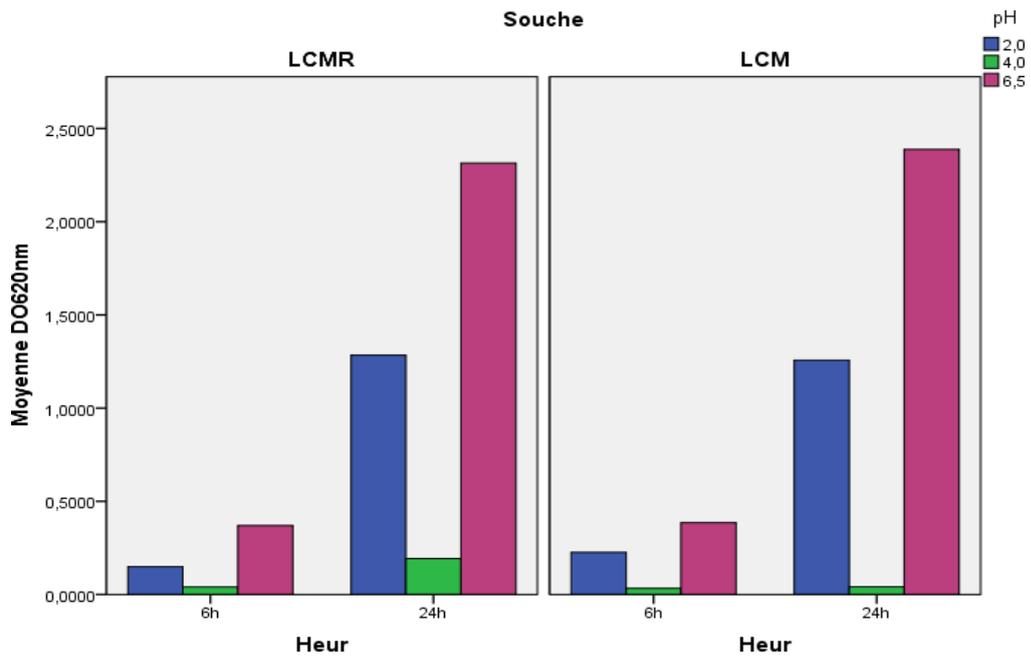


Figure 38 . Tolérances aux acides des souches lactique.

### III.2 Discussion générale

Le lait est un écosystème naturel des bactéries lactiques. Il est l'un des produits laitiers le plus consommable en raison de son importance nutritionnelle (**Paci Kora,2004 ; Kiemptore,2013**).

Notre étude consiste à isoler, purifier et identifier des souches lactiques à partir du lait de chèvre sur les milieux MRS et M17 afin d'évaluer par la suite leur potentiel probiotique. Les bactéries lactiques ont la réputation d'avoir des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes rendant parfois leur culture fastidieuse en laboratoire. De fait de leurs exigences nutritionnelles, les milieux de culture doivent être riches en sucre, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (**Pilet et al., 2005**).

Les tests préliminaires de l'examen macro-microscopique de cette étude ont été réalisés pour différencier entre bactéries lactique et d'autres bactéries. Tous les isolats testés sont de Gram +, catalase -, oxydase -. Selon les caractères de détermination des bactéries lactique (bactéries à gram +, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative) (**Motyl et al.,2009**). Les 20 isolats obtenus à partir du lait de chèvre sont des bactéries lactiques.

Les résultats microscopiques de notre étude ont montré la présence de 2 formes coque et coccobacille avec une présence majoritaire de coque (90%) par rapport au coccobacille. Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées dans le même contexte que le nôtre et réalisées sur des produits laitiers tels que les laits crus et les fromages (**Badis et al.,2005 ; Hammi ,2016 ; Benhouana ,2019**), mais contrairement aux résultats trouvés par Tahlaiti (2019) qui a noté une prédominance des bâtonnets par rapport aux coques. Ces résultats peuvent être expliquée par le fait que les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d'analyse (**Saidi et al., 2002**).

L'identification des souches a été réalisée en suivant les recommandations de Carr et al. (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006). L'orientation de l'identification est basée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (3% ; 6,5%) et le type fermentaire (**König et Fröhlich, 2009**).

Les souches de nos études sont thermophiles poussent à 45°C sauf la souche (LCM6) est mésophile capable à se développer qu'à 22°C et 30°C. Tous les isolats sont homofermentaires ne produit pas de gaz et elles peuvent croître à une concentration de NaCl de 3% et 6.5%.

Sur la base de nos résultats et en se référant sur les calés d'identification des bactéries lactique : les 10souches isolées sur gélose MRS appartienne au genre *Pediocoques*, tandis que les 9 souches ensemencée sur milieu M17 sont des *streptococcus thermophilus*.

La deuxième étape de notre étude consiste à mettre en évidence les bactéries lactiques qui ont un potentiel probiotique, en étudiant leur activité antibactérienne, antibiogramme, thermorésistance, tolérance aux sels biliaires et à l'acide.

L'activité antimicrobienne directe est une propriété très importante dans la sélection des probiotiques, permettant ainsi la conservation des aliments et la prévention des infections gastro-intestinales (**Champomier-vergès et al., 2020**).

Les résultats des interactions bactériennes par la méthode directe entre les souches inhibitrices (bactéries lactiques) et les souches indicatrices (bactéries pathogènes) témoignent que les souches du genre *Pediocoque* et *streptococcus thermophilus* possèdent la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes dont le spectre d'inhibition est de 83% cas d'inhibition et 17% d'absence d'inhibition, avec des diamètres qui varie en fonction de la bactérie indicatrice et en fonction de la bactérie lactique.

Nos résultats ont démontré que le taux d'inhibition vis-vis d'*Escherichia coli* et de *Bacillus Spizizenii* est de 100% et 85% contre *Pseudomonas Aeruginosa*, alors que contre *Staphylocoque Aureus* et *Klebsiella Pneumoniae* est de 65%.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bougeurra, (2020) et Mokdad, (2020)** qui ont constaté que les isolats lactiques étaient actifs contre toutes les bactéries indicatrices à Gram (+) et à Gram (-) et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre.

La présence des zones d'inhibition en cas d'utilisation d'une culture lactique entière est due au métabolisme du lactose en acide lactique qui abaisse le pH et crée un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes (**Fleming et al., 1975 ; Barefootet klaenhammer, 1983**), au peroxyde d'hydrogène (**Barefoot et Klaenhammer, 1983**) ou aux bactériocines (**Klaenhammer, 1993 ; Benyoucef, 2018**).

Plusieurs études ont montré que l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes est due à la libération des substances de nature protéique (les bactériocine) (**Klaenhammer,1993 ; Benyoucef,2018**).

Il serait donc utile d'identifier la nature (bactériocine ou autre) et le nombre de molécules bioactives responsables de cette activité. De ce fait, lors de cette étude, nous avons entamé la recherche des bactériocines par la méthode de diffusion (puits).

En travaillant dans les conditions expérimentales permettant d'éliminer l'influence des acides, nos souches *Streptococcus thermophilus* et *Pediococcus* sp n'ont révélé aucun spectre d'inhibition contre les cinq souches Pathogènes testés. Ces résultats obtenus témoignent que nos souches ne sont pas capables de produire des bactériocines. Ce qui concorde avec ceux de **Remdane et Djeni (2021)**.

Les probiotiques devraient ne pas être pathogènes ou toxigènes. En raison de leur consommation humaine, la sécurité de ces organismes est primordiale car leur résistance aux antibiotiques peut constituer l'une des menaces possibles (**Zarour et al., 2018**).

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). Il est nécessaire avant de lancer une culture probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques (**Ammor et Mayo., 2007**). L'étude de la résistance, des souches lactiques, aux conditions gastriques et intestinales simulées, à leur adhésion aux cellules épithéliales de la ligné animale et leur activité antibactérienne contre des microorganismes pathogènes.

Pour cela, dans cette étude, différents groupes d'antibiotiques ont été mis en test. La majorité des souches du genre *Pediocoques* étaient sensibles à l'Érythromycine, l'amoxicilline, chloramphénicol et la Gentamicine tandis, qu'elles présentent une intermédiaire de sensibilité avec la Clindamycine.

Cependant, les *Streptococcus thermophilus* présentent une sensibilité à l'érythromycine, clindamycine, oxacilline, Gentamicine, par contre elles varient entre sensible et intermédiaire à l'Amikacine, et elles présentent une résistance au chloramphenicol.

Nos résultats se rapprochent de ceux de **Mokdad et al. (2020)**. Il convient de noter que la résistance aux antibiotiques des bactéries de la culture de démarrage ne présente pas de risque direct pour les consommateurs car elles ne sont pas pathogènes.

La résistance aux sels biliaires est l'un des critères importants pour la sélection des souches probiotiques car l'intestin grêle et le côlon sont les premières niches de colonisation de l'organisme hôte par les souches probiotiques (**Aynur Ahmadova et al., 2013**). L'exposition des cultures de nos souches à différentes concentrations de sels biliaires (0.3% et 1%) a montré que la plupart des *Pediococcus* ont très bien survécu en présence de 0.3% de sels biliaires (95%), cependant une diminution de la résistance a été constatée en présence de 1% (52%) de sels biliaires. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Benyoucef et al. (2017)**.

Le pourcentage de viabilité de *S. thermophilus* était comparable à celui du témoin, et était estimé à 98% et de 96% pour les concentrations de 0.3% et 1%. Cependant les souches de *S. thermophilus* ont montré une plus grande tolérance aux sels biliaires que les *Pediococcus*. Nos résultats sont similaires avec ceux de **Bagci et al. (2019)**.

Le critère essentiel dans la sélection d'un microorganisme potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre dans le tractus digestif et notamment aux pH acides (**Argyryet al., 2013**). C'est la raison pour laquelle nous avons testés l'exposition prolongée de nos souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par leur exposition à différents ph (2 ;4 et 6,5) pendant 6h et 24 h d'incubation

Les résultats de la tolérance à l'acidité *in vitro* montrent que toutes les souches du genre *Pediococcus* et de *streptococcus thermophilus* ont pu survivre à pH acides, une légère réduction par rapport au contrôle a été enregistrée à pH=4 et pH=2 par rapport aux pH=6.

Les résultats obtenus sont en accord avec les données bibliographiques qui dit que le pH des bactéries lactiques est compris entre 5 et 7 (**Novel, 1993**).

De même, la plupart des bactéries lactiques comme les streptocoques sont naturellement bien adaptés à un pH acide, elles sont capables non seulement de produire des acides mais de fonctionner à pH acide. Nos résultats montrent également que les *pediocoques* tolère aussi l'acidité, ceux-ci sont en accord avec ceux trouvés par **Millette et al., (2007)**.

D'après nos résultats, on peut dire que nos souches lactiques isolées du lait de chèvre du genre *Pediococcus* et *Streptococcus thermophilus* pourraient être de bons candidats probiotiques.

# Conclusion

Les bactéries lactiques ont un intérêt majeur pour l'amélioration de la qualité et de la sécurité alimentaire. Elles sont utilisées tant que supplément nutritionnel et médicamenteux qui exercent un effet bénéfique à la santé humaine et animale. Ces bactéries d'origine laitière, nous montrent après chaque étude effectuée des particularités surprenantes les unes que les autres.

Le rythme d'apparition de nouveaux produits probiotiques est en augmentation constante depuis plusieurs années, c'est une progression au nombre de publications scientifiques consacrées aux probiotiques.

L'objet principal de cette étude était donc d'évaluer quelques aptitudes probiotiques après l'isolement des bactéries lactiques partir du lait de chèvre provenant de la région de Blida. A travers nos résultats, il ressort que :

- Sur la base des tests de la microbiologie classique, nous avons pu isoler, sélectionner et pré-identifier de 10 souches lactiques appartenant au genre *Pediococcus* et 10 souches de *Streptococcus thermophilus*.
- Les résultats de l'étude des aptitudes technologiques ont montré que l'ensemble des *Pediococcus* et *Streptococcus thermophilus* étudiés présentent *in vitro* des propriétés probiotiques intéressantes telle que le pouvoir antibactérien, résistance aux antibiotiques et enfin la tolérance aux stress acide et aux sels biliaires. Toutefois, cette étude est un point de départ pour approfondir et caractériser les propriétés biotechnologiques des bactéries lactiques. De plus, ces informations pourraient être utilisées dans l'élaboration d'un programme de recherche afin d'identifier et de sélectionner des souches probiotiques à des fins thérapeutiques.
- Selon le test d'antagonisme nous avons trouvé que nos souches étaient productrices de substances inhibitrices vis-à-vis des bactéries pathogènes, de plus les souches lactiques ont montré une résistance modérée vis-à-vis des conditions hostiles telles que les sels biliaires à 0,3% et 1% dont on a remarqué une certaine résistance même après 24h d'exposition.

Cette recherche s'inscrit dans la perspective d'une future utilisation des souches probiotiques sélectionnées dans le contrôle et le traitement des infections. Par conséquent d'autres études sont nécessaires pour justifier leur emploi en tant que telles. Ces dernières doivent être axées sur :

- L'Application du génie génétique pour l'identification des souches lactiques isolées.
- L'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales d'origine humaines.
- La purification des substances antimicrobiennes synthétisées par ces souches afin de confirmer leur nature et leurs modes d'action.
- Etude des propriétés technologiques (la protéolyse, la lipolyse, pouvoir acidifiant).
- L'étude de l'hydrophobicité et auto agrégation.
- Evaluation in vivo de profil probiotique.

# **Références Bibliographiques**

### A

- **Abid, Z. (2020).** Étude de l'activité antimicrobienne des souches isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien « Jben », Master en biologie sciences des aliments, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Tlemcen.
- **Ahirwar, SS, Gupta, MK, Gupta, G., & Singh, V. (2017).** Dépistage, isolement et identification des espèces de lactobacilles des caries dentaires des enfants. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6 (1), 497-503.
- **Ahmadova, A., Todorov, SD, Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, TM, Kuliyeu, A., ... & Haertlé, T. (2013).** Évaluation de l'activité antimicrobienne, des propriétés probiotiques et de l'innocuité de la souche sauvage *Enterococcus faecium* AQ71 isolée du fromage Motal azerbaïdjanais. *Contrôle alimentaire*, 30 (2), 631-641.
- **Aissaoui, M., Deghnouche, K., Bedjaoui, H., & Boukhalifa, H. H. (2019).** Caractérisation morphologique des caprins d'une région aride du Sud-Est de l'Algérie. *Rev. Méd. Vét*, 170(7), 149-163.
- **Ait-Belgnaoui, A., Han, W., Lamine, F., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Theodorou, V. (2006).** Le traitement par *Lactobacillus farciminis* supprime l'hypersensibilité viscérale induite par le stress : une action possible par interaction avec la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales. *Gut*, 55 (8), 1090-1094.
- **Alard, J. (2017).** Sélection in vitro et in vivo de souches probiotiques ayant des propriétés bénéfiques contre l'inflammation, les infections et l'obésité (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- **Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait*, 1-74.
- **Ammor, M.S. et Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*. 76 : 138-146.
- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006).** Activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries d'altération et pathogènes isolées d'une même filière artisanale de viande : 1- Dépistage et caractérisation des composés antibactériens. *Contrôle alimentaire*, 17 (6), 454-461.

- **Amroun, T. T., & Zerrouki, N. (2014).** Caractérisation de la composition biochimique du lait de chèvres Kabyles élevées en région montagneuse en Algérie. *Rencontres Recherche Ruminants*, 21, 293.
- **Argyry, A.A., G., Zoumpopoulou, K.A., Karatzas, E. Tsakalidou, G. J. Nychas, E. Z. Panagou and C. C. Tassou, (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olive by in vitro tests. *Food.Microbiol.*33 (2) :282-291.
- **Aries, n., soufane, y., & rahmoune, y. E. (2018).** Optimisation de la fabrication d'un fromage à pâte pressée à partir du lait de chèvre (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- **Axelsson, L.T. (2004).** Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology, In *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and functional aspects*. Edited by S, Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.

### *B*

- **Badis, A., Laouabdia, S., Guetarni, D., Kihal, M., et Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales" Arabia et kabyle". *Sciences and Technologie*, 23, 30-37.
- **Bahri, F. (2014).** Isolment et caracterisation des souches de lactobacilles a caracteres probiotiques à partir de selles d'enfants.
- **Begley, M., Gahan, CG et Hill, C. (2005).** L'interaction entre les bactéries et la bile. *Revue de microbiologie FEMS*, 29 (4), 625-651.
- **Belfar, A., & Ferahtia, C. (2020).** Conditions et modalités de commercialisation des produits laitiers crus et dérivés dans la région de M'Sila (Thèse de doctorat, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
- **Belkeziz, L. (2020).** Les lactobacilles : rôle physiologique et intérêts en santé humaine (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université Mohamed V de Rabat Faculté de médecine et de pharmacie, 123p).
- **Benhoua, I. (2019).** Recherche et exploitation des exo polysaccharides produits par les bactéries lactiques et leur application, thèse de doctorat en microbiologie, université Ahmad Ben Bella 1, Oran.

- **Bouaguel, R., Bouguedah, L., & Medjoudj, H. (2020).** Caractérisation microbiologique des fromages traditionnels « Michouna et Adghess » préparés à partir du lait de chèvre.
- **Bouglé, D., Roland, N., Lebourrier, F., & Arhan, P. (1999).** Effet de la supplémentation en propionibactéries sur les bifidobactéries fécales et le temps de transit segmentaire du côlon chez des sujets humains sains. *Revue scandinave de gastroentérologie*, 34 (2), 144-148.
- **Bouguerra Asma. (2020).** Evaluation de potentiel probiotique de doctorat. Bactéries lactiques productrices des bactériocine Université Ferahet Abes Sétif.
- **Bouguerra, A. (2021).** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle (Doctoral dissertation).
- **Brunser, O., & Gotteland, M. (2010).** Probiotiques et prébiotiques en santé humaine : un aperçu. *Aliments bioactifs dans la promotion de la santé*, 73-93.
- **Burgain, J., Gaiani, C., Jeandel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol, A. M., & Scher, J. (2012).** Maldigestion du lactose : formes cliniques et solutions thérapeutiques. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 47(4), 201-209.

### C

- **Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey, *Critical Reviews in microbiology*, 28(4) :281-370.
- **Chemlal-Kheraz, D. (2013).** Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des science département de biologie, 217p).
- **Christian (2006).** In Contribution à l'étude la caractérisation de lactocoques indigènes isolés du lait cru de la chèvre et les produits laitier algérien. Thèse de doctorat : Option Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Université d'Oran.
- **Corr, SC, Hill, C. Et Gahan, CG (2009).** Comprendre les mécanismes par lesquels les probiotiques inhibent les pathogènes gastro-intestinaux. *Progrès de la recherche sur l'alimentation et la nutrition*, 56, 1-15.
- **Corrieu, G., & Luquet, F. M. (2008).** Bactéries lactiques.

### *D*

- **Derouiche, M., & Zidoune, M. (2015).** Caractérisation d'un fromage traditionnel, le Michouna de la région de Tébessa, Algérie. *Livestock Research for Rural Development*, 27(11).
- **Dib, H., Hajj Semaan, E., Mrad, R., Ayoub, J., Choueiry, L., Moussa, H., & Bitar, G. (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal*, 13(1), 43-48.
- **Dib, N., Filali, R., & Medjoudj, H. (2018).** Caractérisation des paramètres microbiologiques et physicochimiques du fromage Bouhezza au cours de sa conservation par réfrigération
- **Dib, W. (2015).** Caractéristiques et rôle probiotiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre : Effet immuno-modulateur chez la souris Balb/thèse de doctorat. Université d'Oran.
- **Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1).

### *E*

- **EZZARIGA, N. (2015).** PROBIOTIQUES : Applications thérapeutiques et Effets secondaires (Doctoral dissertation).

### *F*

- **FAO, (2002).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 5 : laits fermentés. Collection FAO / Alimentation et Nutrition. 28,7p.
- **FAO/WHO (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in Food in Report of a Joint FAO/WHO. C. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture. Organization of the United Nations and World Health Organization : Ontario.

- **FAO/WHO, experts, (2001).** Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Cordoba, Argentine, Pp34.
- **Fleming, H.P, et chells, J. L, et Costilow. R. N. (1975).** Microbiol Inhibition by an Applied Microbiology.vol. 30, N°. 6. P. 10401042.
- **Fung, WY, Lye, HS, Lim, TJ, Kuan, CY et Liong, MT (2011).** Rôles des probiotiques sur la santé intestinale. Dans Probiotiques (pp. 139-165). Springer, Berlin, Heidelberg.

### *G*

- **Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos MI, et Larpent JL. (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier Tec&Doc. Paris.

### *H*

- **Hadef Saida. (2012).** Contribution à l'évaluation de quelques caractères probiotiques du lactobacille isolés à partir des matières fécales des poulets.
- **Hammes, W. P. Et Hertel, C. (2006).** The genera Lactobacillus and Carnobacterium. Chap.1.2.10. In prokaryotes. 4 : 320-403.
- **Hammi, L. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocine produite par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et des différentes variétés de fromage français, thèse en science chimique, université de Strasbourg, France.
- **Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013).** Bactéries lactiques en tant que probiotiques : caractéristiques, critères de sélection et rôle dans l'immunomodulation de la barrière muqueuse gastro-intestinale humaine. Bactéries lactiques - R & D à des fins alimentaires, sanitaires et d'élevage ; Kongo, M., éd., 197-216.
- **Hicham, LAKEHAL** Les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du lait de (Vache, Brebis et Chèvre).
- **Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., ... & Kleerebezem, M. (2005).** De nouvelles connaissances sur la biologie moléculaire et la physiologie de Streptococcus thermophilus révélées par la génomique comparative. Revues de microbiologie FEMS, 29 (3), 435-463.

### *K*

- **Kailasapathy, K. (2002).** Microencapsulation de bactéries probiotiques : technologie et applications potentielles. Problèmes actuels de microbiologie intestinale, 3 (2), 39-48.
- **Klaenhammer, T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria FEMS Microbiology, 12 :39-8.
- **König, H. Et Fröhlich, J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Kumar, H., Yadav, D., Kumar, N., Seth, R., & Goyal, A. K. (2016).** Nutritional and nutraceutical properties of goat milk-a review. Indian J. Dairy Sci, 69, 513-518.

### *L*

- **Labioui, h., elmoualdi, l., el yachioui, m., & ouhssine, m. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 144(3-4), 237-250.
- **Lahtinen, SJ, & Endo, A. (2011).** Effets sur la santé des probiotiques non viables. Bactéries lactiques : aspects microbiologiques et fonctionnels, 4e éd. CRC Press, Boca Raton, 670-685. N2012.
- **Lahtinen, SJ, & Endo, A. (2012).** Effets sur la santé des probiotiques non viables. Bactéries lactiques : aspects microbiologiques et fonctionnels, 4e éd. CRC Press, Boca Raton, 670-685.
- **Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., & Zerrouq, F. (2016).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie, 10(4), 267-277.
- **Lapointe-Vignola, C. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses inter Polytechnique.
- **Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel.

### *M*

- **Mercenier, A., Pavan, S., & Pot, B. (2003).** Les probiotiques comme agents biothérapeutiques : état des lieux et perspectives d'avenir. *Conception pharmaceutique actuelle*, 9 (2), 175-191.
- **Mermouri, I. (2018).** Étude de l'effet de souches probiotiques de bactéries Lactiques (*Lactobacillus* spp.), isolées de produits fermentés, sur la valeur nutritive de fourrages conservés par ensilage (Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf des Sciences et de la Technologie-Mohamed Boudiaf d'Oran).
- **Midassirou B, Mahdhi A, Chaieb K, Bakhrouf A. (2012).** Recherche de bactéries lactiques et étude in vitro de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* pp,147-16
- **Millette, M., C. Dupont, F. Shareck, M.T. Ruiz, D. Archambault and M. Lacroix. (2007).** Purification and identification of the Pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*.
- **Mokdad Fayeza. (2020).** Influence des leuconostocs produisant des bactérocinés des produits les caractéristiques industrielles laitier. Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bela
- **Morelli, L. (2007).** Évaluation in vitro des bactéries probiotiques : de la survie à la fonctionnalité. *Journal laitier international*, 17 (11), 1278-1283.
- **Motyl I, Klewicka E, Libudzisz, Z. (2009).** New strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei*. *Polish Patent Application* 147-160.
- **Muller, JA, Ross, RP, Fitzgerald, GF et Stanton, C. (2009).** Fabrication de bactéries probiotiques. Dans *Science et technologie des prébiotiques et des probiotiques* (pp. 725-759). Springer, New York, NY.

### *N*

- **Natcha, C., Sina, H., Kayodé, APP, Gbenou, JD, & Baba-Moussa, L. (2017).** Activité antimicrobienne et composition chimique de « Kpètè-Kpètè » : une entrée de bière traditionnelle béninoise Tchoukoutou. *Biomed Research International*, 2017.

- **Ng, SC, Hart, AL, Kamm, MA, Stagg, AJ et Knight, SC (2009).** Mécanismes d'action des probiotiques : avancées récentes. *Maladies intestinales inflammatoires*, 15 (2), 300-310.
- **Nousiainen, J., & Setälä, J. (1993).** Les bactéries lactiques comme probiotiques animaux. *Bactéries lactiques.*, 315-356.
- **Nousiainen, J., & Setälä, J. (2014).** Les bactéries lactiques comme probiotiques animaux. *Bactéries lactiques.*, 315-356.
- **Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques. In Leveau JY et Bouix M (Ed.), *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. 170-3310.

### O

- **Oelschlaeger, TA (2010).** Mécanismes d'action des probiotiques - une revue. *Journal international de microbiologie médicale*, 300 (1), 57-62.
- **Oliveira, PM, Brosnan, B., Furey, A., Coffey, A., Zannini, E. Et Arendt, EK (2015).** Bioprotection des bactéries lactiques appliquée au processus de maltage. Partie I : Caractérisation des souches et identification des composés antifongiques. *Contrôle alimentaire*, 51, 433-443.
- **OMS (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report.

### P

- **Paci Kora, E. (2004).** Interactions physicochimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la saveur, thèse : science des aliments, institut national agronomique, Paris, France, p17.
- **Pilet, M.F., Magras C., Federighi M. (2005).** Bactéries lactiques. In : *bactériologie alimentaire (Federighi M.)*, 2e Ed., Economica, Paris. 219-240.
- **Pintado, MM, Gomes, AM et Freitas, AC (2014).** Les probiotiques et leur rôle thérapeutique. *Bactéries probiotiques : fondamentaux, thérapeutiques et aspects technologiques*, 1ère éd. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapour, 47-94.

- **Piquepaille, C. (1987).** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales.

### R

- **Rayavarapu, B., & Tallapragada, P. (2019).** Evaluation des caractères probiotiques potentiels de *Lactobacillus fermentum*. Étude et recherche scientifiques. *Chimie & Génie Chimique, Biotechnologie, Agroalimentaire*, 20 (2), 183-197.
- **Robin JM. Et Rouchy A. (2001).** Les probiotiques. CEDN. Nutrithérapie. Info.1-4.
- **Ross, RP, Desmond, C., Fitzgerald, GF et Stanton, C. (2005).** Surmonter les obstacles technologiques dans le développement d'aliments probiotiques. *Tourillon de microbiologie appliquée*, 98 (6), 1410-1417.

### S

- **Saidi, N., Guessas, B., Bensalah F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., Prevost, H. Et Kihal, M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides, *J. Aleg. Reg. Arides*. 1 : 1-11.
- **Saiz Vieco, N. (2019).** Potentiel probiotique et activités anti\_clostridium perfringens établies in vitro et in vivo pour des souches du genre *Lactobacillus* nouvellement isolées du caecum de poulets (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université de Lille école doctorat les sciences de la matière, du rayonnement et de l'Environnement, France, 213p).
- **Sandine, WE, Radich, PC et Elliker, PR (1972).** Ecologie des streptocoques lactiques. Une critique. *Journal of Milk and Food Technology*, 35 (3), 176-185.
- **Sawsen, H. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales.
- **Shah, NP (2007).** Cultures fonctionnelles et bienfaits pour la santé. *Revue laitière internationale*, 17 (11), 1262-1277.
- **Shah, NP (2009).** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262-1277.

- **Shima, M., Matsuo, T., Yamashita, M., & Adachi, S. (2009).** Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 281-285.
- **Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. (2011).** Probiotics : A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2) : 287-S290
- **Stoll W. (2003).** Vaches laitières: l'alimentation influence la composition du lait. *RAP Agri*. N° 15/2003, vol. 9
- **Streit, F. (2008).** Influence des conditions de recuit et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* cf11 (Dissertation de doctorat, Thèse pour obtenir le grade de docteur. L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech). Spécialité : génie microbiologique. 226p).

### T

- **TAHLAITI, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).

### V

- **Villeger, R. (2014).** Etude in vitro des propriétés probiotiques de bactéries du genre *Bacillus* : Interaction avec l'hôte et effets de l'association avec un prébiotique (Doctoral dissertation, Université de Limoges).

### W

- **Wissam, S., & Assia, B. (2020).** Etude de l'effet de la race sur la qualité du lait caprin dans la wilaya de Ghardaïa (Doctoral dissertation).

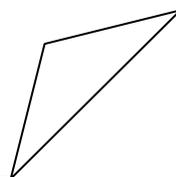
### Y

- **Yusuf, M. A., & Hamid, T. H. (2013).** Lactic acid bacteria : bacteriocin producer : a mini review. *IOSR J Pharm*, 3(4), 44-50.

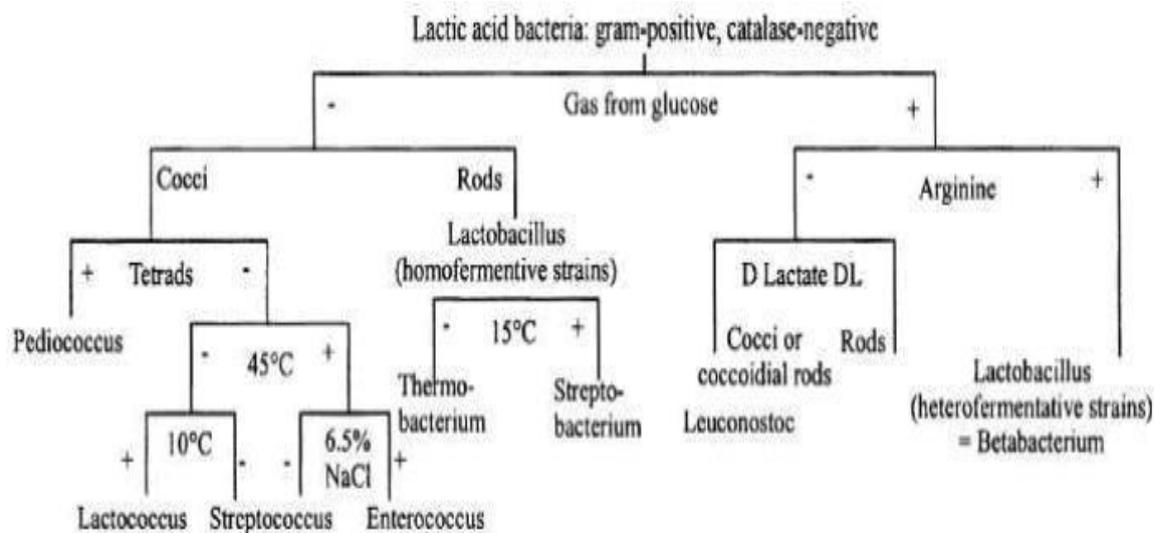
*Z*

- **Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, J. E... & Kihal, M. (2013).** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technology*.

# **Annexes**



### Annexe I : Clef d'identification des bactéries lactique



**Figure 39** .Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carret *al.*,2002)

### Annexe II : La composition des solutions utilisées

○ **La composition d'eau physiologie 9 /ml :**

Eau distillé..... 1000 ml  
 Peptone ..... 1 g  
 NaCl..... 9 g

○ **La composition de tampon phosphate PBS :**

Eau distillé..... 1000 ml  
 NaCl..... 9 g

○ **La composition de solution NAOH 1N :**

Eau distillé ..... 100 ml

NAOH.....40 g

**Annexe II : La composition des réactifs et colorant utilisée**

○ **La composition de violet de gentiane ou cristal :**

Violet de gentiane..... 10 g ou (5 g)

Phénol .....5 g

Ethanol à 0.95 .....20 cm<sup>3</sup>

Eau distillé ..... 1 dm<sup>3</sup>

○ **La composition de Lugol :**

Iode .....5 g

Iodure de potassium..... 10 g

Eau distillé ..... 14 ml

○ **La composition de Fuchsine de Ziehl :**

Fuchsine basique..... 10 g

Phénol .....50 g

Ethanol.....0.5 cm<sup>3</sup>

Eau distillé ..... 1 dm<sup>3</sup>

---

### Annexe III : la composition des milieux de culture

#### ○ La composition gélose MRS :

Peptone .....	10 g
Extrait de viande.....	8 g
Extrait de levure.....	4g
Glucose .....	20 g
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g
Citrate d'ammonium.....	2g
Tween 80 .....	1 ml
hydrogénophosphate de potassium.....	2 g
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	0.2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté .....	0.05 g
Agar .....	10 g
Eau distillée .....	1000 ml
PH.....	6.2

- La composition de boillon MRS : tous les composants de gélose MRS sauf l'agar.
- Autoclave 120 ° pendant 20 min

#### ○ La composition de milieu Mueller Hinton

Extrait de viande.....	2 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5 g
Amidon .....	1.5 g
Agar .....	10 g
Eau distillé.....	1000 ml
PH.....	7.4

- Autoclave 120 ° pendant 20 min

○ **La composition gélose M17 :**

Tryptone.....	2,5 g
Peptone papainique de soja.....	5 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Extrait de viande.....	5 g
Extrait de levure.....	2,5 g
Béta-Glycérophosphate de sodium.....	19 g
Sulfate de magnésium.....	0,25 g
Lactose.....	5 g
Acide ascorbique .....	0,5 g
Agar-agar bactériologique .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml
PH.....	7,1 ± 0,2

- La composition de boillon M17 : tous les composants de gélose M17 sauf l'agar.
- Autoclave 120 ° pendant 20 min

○ **La composition la gélose nutritive :**

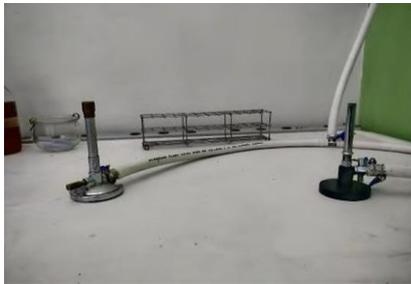
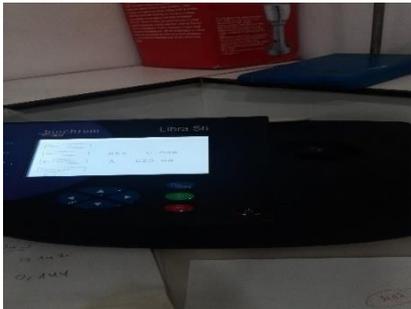
Peptone .....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Eau distillé.....	1000 ml
Agar .....	15 g
PH.....	7.2

- Autoclave 120 ° pendant 20 min

## **Annexe IV : Appareillage et Verrerie.**

- **Verrerie**
  - Erlenmeyer de 1000 ml .
  - Flacons stériles de 200 ml.
  - Lame et lamelle en verre .
  - Pipette pasteur .
  - Tubes stériles .
  
- **Autres matériels et Produits chimiques :**
  - Boîtes Pétri
  - Anse de platine
  - Portoirs
  - Papier parafilm
  - Barreau magnétique
  - Seringue stérile
  - Ecouvillon
  - Huile d'immersion
  - Glycérol
  - Alcool 95°
  - N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
  - Le peroxyde d'hydrogène

○ Figures des appareils utilisées

<p><b>Bec bunsen</b></p> 	<p><b>Bain marie</b></p> 	<p><b>Etuve bactériologique à 37 °</b></p> 
<p><b>Etuve bactériologique à 45 °</b></p> 	<p><b>Autoclave</b></p> 	<p><b>Balance de précision</b></p> 
<p><b>Agitateur vortex</b></p> 	<p><b>Agitateur muni d'une plaque chauffante</b></p> 	<p><b>Réfrigérateur</b></p> 
<p><b>Spectrophotomètre</b></p> 	<p><b>PH mètre</b></p> 	<p><b>Centrifugeuse</b></p> 