

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Hassiba Ben Bouali – Chlef



Faculté des sciences de la terre et sciences biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister
Option : Sciences Alimentaires

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE SOUCHES DE
LACTOCOCCUS LACTIS A PARTIR DE DIFFERENTS LAITS
DANS LE PERIMETRE DU MOYEN CHELIFF**

Présenté par : Nehal Fatima

Soutenu le 30/09/2007

Devant le jury d'examen :

- | | | |
|---|--------------|-------------------|
| - M ^{elle} KOUADRI MUSTEFAI S. | Présidente | M.C. UHB Chlef |
| - M ^r DILMI-BOURAS A. | Promoteur | M.C. UHB Chlef |
| - M ^r EL-HAMEUR H. | Co-Promoteur | C.C. UHB Chlef |
| - M ^r RIAZI A. | Examineur | M.C. U Mostaganem |
| - M ^r BENSALD A. | Examineur | M.C. UHB Chlef |

Année universitaire : 2006/2007

Liste des abréviations

ATP	: Adénosine triphosphate.
°C	: Degré Celsius.
°D	: Degré Dornic.
g	: gramme.
Kg	: Kilo gramme.
L	: Litre.
g	: microgramme.
mg	: milligramme.
ml	: millilitre.
nm	: nanomètre.
%	: Pourcent.
pH	: Potentiel d'hydrogène.
Subsp	: sous-espèce.
mn	: minute

Dédicaces

*Ce modeste document est dédiée en marque de reconnaissance et
profonde affection à :*

- ☞ Le mémoire de mon père*
- ☞ Ma très chère mère qui m'a tant apportée*
- ☞ Mon mari qui m'a soutenu durant toute la durée de réalisation de ce
travail*
- ☞ Ma sœur Fettouma que je remercie vivement*
- ☞ Ma fille Hadil*
- ☞ Toutes mes amies*
- ☞ Mes meilleurs amis : Nabila, Sarah et Mahdjouba*

N. Fatima

Remerciements

Au terme de ce labeur, je réalise que ce travail n'aurait pas vu le jour sans le concours de mon promoteur.

Mr. Dr A. DILMI- BOURAS, maître de conférences et doyen de la faculté des sciences agronomiques et sciences biologiques à Chlef, pour son soutien, son aide et ses conseils qu'il m'a apporté dans la réalisation de ce travail.

Mr. H. EL-HAMEUR, co-promoteur, chargé de cours à l' UHB, Chlef, à qui je témoigne de ma sincère reconnaissance et vive gratitude pour son assistance, de part sa disponibilité, son savoir et l'impartialité de ses avis.

Mes vifs remerciements vont aussi aux membres de jury :

Melle. S. KOUADRI- MUSTEFAL, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail et de présider ce jury.

Mr. Dr. A. RIAZI, maître de conférences à l'université de Mostaganem, que je tiens à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr. Dr. A. BENSALID, chargé de cours à l' UHB Chlef, que je tiens aussi à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également Mr. ZEMOURI et Mr BRADI, de leurs aide précieuse et leur disponibilité.

Tous mes remerciements vont également à l'ensemble des professeurs et du personnel de notre faculté.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à ma famille et en particulier ma mère et mon mari qui m'ont apporté aide et soutien.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Catabolisme du lactose chez les bactéries lactiques.....	24
FIGURE 2 : Différentes voies de transformation anaérobie du citrate chez les bactéries lactiques.....	26
FIGURE 3 : Schéma récapitulatif de la protéolyse du lait par les bactéries lactiques.....	29
FIGURE 4 : Situation de la zone d'étude.....	33
FIGURE 5 : Diagramme ombrothermique d'après les données de l'ONM de 1981/1982 à 2003/2004.....	35
FIGURE 6 : Situation des communes de la vallée du moyen Cheliff.....	36
FIGURE 7 : Répartition des cultures dans les zones du périmètre du moyen Cheliff pour l'année 2004.....	37
FIGURE 8 : Répartition de l'élevage dans le Moyen Cheliff (année 2004).....	37
FIGURE 9 : Evolution de l'élevage dans la vallée do Moyen Cheliff pour les années 2002, 2003 et 2004.....	38
FIGURE 10 : Diagramme d'isolement et de purification.....	42
FIGURE 11 : Diagramme d'identification des lactocoques.....	43
FIGURE 12 : Isolement des lactocoques sur milieu M17.....	53
FIGURE 13 : Résultat du test de la citratase.....	61
FIGURE 14 : Résultat du test de fermentation sur milieu complexe.....	61
FIGURE 15 : Résultat du test de fermentation du galactose.....	62
FIGURE 16 : Résultat du test du lait de Sherman.....	62
FIGURE 17 : Distribution des souches dans le lait de brebis.....	64
FIGURE 18 : Distribution des souches dans le lait de brebis en fonction des saisons.....	64
FIGURE 19 : Distribution des souches dans le lait de vache.....	65
FIGURE 20 : Distribution des souches dans le lait de vache en fonction des saisons.....	65
FIGURE 21 : Distribution des souches dans le lait de chèvre.....	65
FIGURE 22 : Distribution des souches dans le lait de chèvre en fonction des saisons.....	65
FIGURE 23 : Courbe de production de diacétyle pour les souches <i>Lc. D2</i> et <i>Lc. D4</i> en cultures pures sur lait de vache.....	77
FIGURE 24 : Evolution de l'acidité des deux souches <i>Lc.L9</i> et <i>Lc.D4</i> en fonction du temps.....	75

FIGURE 25 : Evolution de production de diacétyle de Lc.L9 et Lc.d4 en fonction du temps.....	75
FIGURE 26 : Evolution de l'acidité Dornic à 30 °C, en fonction du temps, des cultures pures de Lc.L1, Lc.L2, Lc.L3, Lc.L4, Lc.L5 et Lc.L*.....	79
FIGURE 27 : Evolution de l'acidité Dornic à 30 °C, en fonction du temps, des cultures pures de Lc.L6, Lc.L7, Lc.L8, Lc.L9, Lc.L10 et Lc.L*.....	79
FIGURE 28 : Evolution de l'acidité Dornic à 30 °C, en fonction du temps, des cultures pures de Lc.L11, Lc.L12, Lc.L13, Lc.L14, Lc.L10 et Lc.L*.....	80
FIGURE 29 : Evolution de l'acidité Dornic à 30 °C, en fonction du temps, des cultures pures de Lc.C1, Lc.C2, Lc.C3 et Lc.C*.....	80
FIGURE 30 : Evolution de l'acidité Dornic à 30 °C, en fonction du temps, des cultures pures de Lc.D1, Lc.D2, Lc.D3 et Lc.D4.....	81
FIGURE 31 : Evolution du pH, en fonction du temps, des souches mésophiles à 21 °C.....	84
FIGURE 32 : Evolution du pH, en fonction du temps, des souches mésophiles à 30 °C.....	84
FIGURE 33 : Histogramme de variabilité en fonction des facteurs.....	88
FIGURE 34 : Cercle de corrélation des variables entre les deux premiers axes.....	90
FIGURE 35 : Projection des individus sur le plan formé par les deux axes (données expérimentales).....	91
FIGURE 36 : Répartition de <i>lactococcus lactis subsp diactylactis</i> dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons et de l'origine animale.....	93
FIGURE 37 : Répartition de <i>lactococcus lactis subsp cremoris</i> dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons et de l'origine animale.....	94
FIGURE 38 : Répartition de <i>lactococcus lactis subsp lactis</i> dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons et de l'origine animale.....	95

FIGURES EN ANNEXES :

FIGURE 1 : Droite d'étalonnage (dosage du diacétyle).

FIGURE 2 : Mécanisme de résistance à l'acide lactique induit par CitP chez *Lc. diacetylactis*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales constantes physico-chimiques du lait des différentes espèces animales.....	2
Tableau 2 : Composition du lait de vache, de chèvre et de brebis.....	3
Tableau 3 : La composition moyenne en protéines en (g/litre) et leur distribution dans les laits de vache, chèvre et de brebis.....	4
Tableau 4 : Teneurs en vitamines des laits de diverses espèces animales (mg/litre).....	6
Tableau 5 : Teneurs en éléments minéraux des laits de vache, de chèvre et de brebis.....	6
Tableau 6 : Quelques unes des enzymes du lait.....	7
Tableau 7 : Flore originelle du lait cru.....	9
Tableau 8 : Quelques caractéristiques des principales espèces de bactéries lactiques.....	13
Tableau 9 : Flore lactique mésophile.....	14
Tableau 10 : Propriétés des principales bactéries lactiques mésophiles.....	15
Tableau 11 : Flore thermophile.....	15
Tableau 12 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques.....	19
Tableau 13 : Besoins nutritionnels des lactocoques	22
Tableau 14 : Production de diacétyl et d'acétaldéhyde par les lactocoques	30
Tableau 15 : Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.....	40
Tableau 16 : Caractères macroscopiques et microscopiques des souches isolées.....	52
Tableau 17 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de vache durant les différentes saisons.....	54
Tableau 18 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de chèvre durant les différentes saisons.....	55
Tableau 19 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de brebis durant les différentes saisons.....	56

Tableau 20 : Résultats d 'identification des ferments lyophilisés.....	57
Tableau 21 : Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de vache.....	58
Tableau 22 : Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de chèvre.....	58
Tableau 23 : Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de brebis.....	59
Tableau 24 : Auxanogramme des ferments lyophilisés.....	59
Tableau 25 : Distribution moyenne centésimale des sous espèces dans les différents laits de vache, de chèvre et de brebis.....	63
Tableau 26 : Détermination de la variation du pH avec et sans histidine après 24 heures d'incubation.....	67
Tableau 27: Résultats de test d'antibiogramme des souches de <i>Lactococcus lactis</i>	69
Tableau 28: Mesure de l'activité protéolytique des cultures pures de <i>Lactococcus lactis</i> à 30 °C sur lait de Sherman après 24 heures d'incubation.....	70
Tableau 29: Production de diacétyle par les souches <i>Lc.D1</i> , <i>Lc.D2</i> , <i>Lc.D3</i> et <i>Lc.D4</i> sur différents laits.....	72
Tableau 30: Production de diacétyle et l'acide lactique par <i>Lc. L9</i> et <i>Lc. D4</i> sur lait de vache.....	74
Tableau 31 : Résultats de la croissance des souches de culture pures de <i>Lactococcus lactis</i> cultivées sur milieu M17 à 30 °C.....	76
Tableau 32: Caractéristiques des souches de lactocoques pures cultivées à 30 °C.....	85
Tableau 33: Corrélacion entre les variables.....	87
Tableau 34: Valeurs propres et pourcentages respectifs des axes.....	87
Tableau 35: Corrélacion des variables avec les axes principaux.....	89

Tableaux en annexes :

Tableau 1 : Composition du milieu M17 AGAR

Tableau 2: Composition de la gélose semi-solide VF

Tableau 3: Composition de lait de Sherman

Tableau 4 : Composition de lait tournesolé

Tableau 5 : Composition du lait citraté

Tableau 6 : Composition du milieu de Gibson et Abd El Malek

Tableau 7 : Profil fermentaire : eau peptonnée au pourpre de bromocrésol

Tableau 8 : Composition du milieu LTSG

Tableau 9 : Composition du lait écrémé

Tableau 10 : Indicateurs utilisés

Tableau 11 : Evolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques, en fonction du temps, à 30 °C.

Tableau 12 : Statistiques sommaires des variables continues

Tableau 13 : Evolution du pH à 30 °C en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles).

Tableau 14 : Evolution du pH à 21 °C en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles).

Tableau 15 : Evolution de la croissance, en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles), à 30 °C.

SOMMAIRE

Liste des Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

<u>Chapitre 1 : Le LAIT.</u>01
II Généralités.01
1.1/ Caractères organoleptiques	01
1.2/ Caractères physico-chimiques de différents laits01
2/ Composition du lait.02
3/ Système enzymatiques naturels du lait07
4/ Substances antibactériennes du lait08
5/ Qualité bactériologique du lait09
6/ Influence de la nature du lait sur la croissance et l'activité des bactéries lactiques	10
<u>Chapitre 2 : LES BACTERIES LACTIQUES</u>	11
1/ Généralités sur les bactéries lactiques	11
1.1/ Habitat des bactéries lactiques	11
1.2/ Taxonomie des bactéries lactiques	12
2/Ferments lactiques	14
2.1/ Définition et rôle des ferments lactiques	14
2.2/ Composition des ferments lactiques.....	14
2.3/ Critères de sélection de souches pour l'élaboration de ferments	15
3/ Intérêt des bactéries lactiques	17
<u>Chapitre 3 : LES LACTOCOQUES</u>	18
1/ Généralités	18
1.1/ Classification et nomenclature.....	20
1.2/ Habitat des lactocoques	20
1.3/ Exigences nutritionnelles.....	20
2/ Biochimie des lactocoques	23
2.1/ Métabolisme des sucres.....	23
2.2/ Métabolisme du citrate	25
2.3/ Métabolisme des protéines	27

2.4/La lipolyse et l'estérololyse	29
2.5/ Le métabolisme et les minéraux	29
3/ Intérêts technologiques des lactocoques	30
<u>Chapitre 4 : CARACTERISATION DE LA ZONE D'ETUDE</u>.....	32
II Présentation du périmètre du moyen Cheliff.....	32
1.1/ Situation géographique de la zone d'étude.....	32
1.2/Aperçu morphologique	33
2/ Le climat	34
2.1/ Les précipitations	34
2.2/ La température	34
3/ Contexte socio-économique	35
3.1/ Population.....	35
3.2/ Agriculture et élevage.....	36
<u>PARTIE EXPERIMENTALE :</u>	
Chapitre 1 : MATERIELS ET METHODES.....	39
I/ MATERIELS.....	39
1/ Matériel biologique	39
1.1/ Le lait	39
1.1.1/ Techniques de prélèvement du lait.....	39
1.1.2/ Estimation de la charge microbienne des laits prélevés.....	39
1.2/ Origine des souches	39
II/ METHODES	40
I/ Techniques d'isolement et de purification	40
1. 1/ Techniques d'isolement	40
1.2/ Techniques de purification	40
1.3/ Conservation des souches	41
1.4/ Techniques d'identification des souches	41
1.4.1 / Etude des caractères cultureux	41
1.4.2/ Etude des caractères morphologiques des cellules.....	41
1.4.3/ Etude des caractères physiologiques	44
1.4.4/ Etude des caractères biochimiques.....	45
1.4.5/ Caractérisation technologique des souches	47
2/ Traitement des résultats	49
2.1/ Principe de l'ACP	49

2.2/ Système d'information géographique SIG.....	51
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION	52
I/ Isolement et purification	52
II/ Identification des souches	52
1/ Etude des caractères cultureux et morphologiques.....	52
2/ Etude des caractères biochimiques et physiologiques des souches	53
3/ Aptitudes technologiques des souches.....	66
3.1/ Pouvoir pathogène	66
3.2/ L'antibiorésistance.....	68
3.3/ Activité protéolytique.....	70
3.4/ Production de diacétyle.....	71
3.5/ Evolution de la biomasse.....	76
3.6/ Pouvoir d'acidification.....	77
3.6.1/ Analyse statistique.....	86
Conclusion	97
Références bibliographiques	99
Annexes	
Résumé	

Introduction

L'importance des bactéries lactiques n'est plus à démontrer. Elles sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Leur utilisation dans de nombreux domaines et en particuliers dans l'industrie laitière a permis l'élaboration de divers produits en quantités de plus en plus considérables.

En Algérie, les besoins en ferments lactiques et la consommation des produits laitiers évoluent de pair et ils ne cessent de s'accroître. Désormais, l'industrie laitière a toujours recours à leur importation. Cependant, ils ne garantissent pas la typicité des produits laitiers locaux provoquant une perte des caractéristiques organoléptiques originelles des produits.

L'élaboration des ferments spécifiques à partir des micro-organismes locaux sélectionnés pour leur aptitudes technologiques, permet de maîtriser les process technologiques et d'établir un référentiel de base sur nos produits, en constituant en même temps, un élément de garantie de la typicité et de l'origine du produit dans le but d'obtenir une certification.

L'amélioration de souches industrielles utilisées comme ferments peut se faire soit par mutation soit par transfert de gènes améliorants. Cependant, la sélection de souches naturelles selon des critères technologiques bien choisis demeure une possibilité à ne pas négliger (Hermier *et al.*, 1992).

La présente étude s'inscrit dans cet objectif et porte sur les bactéries du genre *Lactococcus* isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis dans le périmètre du moyen cheliff. Un isolement étalé sur trois saisons (hivers, printemps et été) afin d'étudier la répartition temporelle et pédoclimatique de ces espèces dont le rôle économique est à ne pas négliger.

Les souches identifiées selon des tests phénotypiques et technologiques permettront d'établir une banque de souches locales mésophiles à potentiel industriel exploitable et d'essayer de trouver une raison de typicité des espèces isolées à partir de laits de régions données du périmètre du moyen Cheliff ; c'est l'étude de la biodiversité microbienne.

Chapitre 1 : LE LAIT

1/ Généralités

Le lait est défini lors du congrès international de la répression des fraudes « Genève, 1908 : Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, bien portante, bien nourris et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (Debry, 2001).

1.1 / Caractères organoleptiques

- ◆ **Couleur** : Le lait de vache est un fluide aqueux opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β - carotène de sa matière grasse (Lupien, 1995). Blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas de β - carotène, aussi le beurre de chèvre est de couleur blanche (Alais, 1984) ;
- ◆ **Odeur** : Selon Jaubert, (1997), le lait de chèvre a une odeur assez neutre, lorsqu'il est fraîchement trait ; parfois enfin de lactation, il a une odeur caprique tandis que le lait de vache a une odeur faible moins identifiable ;
- ◆ **Saveur** : Le lait de vache et de chèvre possèdent tous deux une saveur douce, agréable, particulière au lait. Ce pendant, le lait de chèvre fraîchement trait possède une saveur neutre, par contre, après stockage au froid, il requiert une saveur caractéristique qui s'avère un critère de sélection (Boyaval et al., 1999).
- ◆ **Aspect** : Les laits de vache, de chèvre et de brebis sont d'aspect homogène, ne présentent pas de grumeaux (FAO, 1990).

1.2/ Caractéristiques physicochimiques de différents laits

Le lait présente des caractéristiques liées à sa nature biologique à savoir : variabilité, hétérogénéité et altérabilité. Ce complexe aqueux possède des caractéristiques physico-chimiques plus ou moins stables, dépendant soit de l'ensemble des constituants comme la densité, soit des substances en solution, comme le point de congélation, ou encore des concentrations en ions, comme le pH (St-Gelais et al., 1999).

Les principales constantes physico-chimiques des différents types de laits sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les principales constantes physico-chimiques du lait des différentes espèces animales.

Constantes	Vache	Chèvre	Brebis
Energie (Kcal/litre)	705	600 - 750	1100
Densité du lait entier à 20°C	1,028 - 1,033	1,027 - 1,035	1,034 - 1,039
Point de congélation (°C)	-0,520- -0,550	-0,550- -0,583	-0,570
pH à 20°C	6,60 - 6,80	6,45 - 6,60	6,50 - 6,85
Acidité titrable (°D)	15-17	14 - 18	22 - 25
Tension superficielle du lait entier à 15°C (dyne/cm)	50	52	45 - 49
Conductivité électrique à 25 °C (siemens)	45×10^{-4}	$43 - 56 \times 10^{-4}$	38×10^{-4}
Indice de réfraction	1,45 - 1,46	1,35 - 1,46	2,86 - 3,93
Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises)	2,0 - 2,2	1,8 - 1,9	1,33-1,40

Source : FAO, (1990).

Ce tableau fait apparaître qu'une ressemblance existe entre les laits de chèvre et de brebis ; ils sont donc très différents du lait humain (FAO, 1990).

La densité ou poids spécifique dépend de deux facteurs principaux qui sont la teneur en matière sèche et celle de la matière grasse (Lupien, 1995). Il faut noter que l'addition d'eau diminue la densité. Ainsi, La densité du lait de brebis et celles des races de chèvre à laits gras est plus élevée que celle du lait de vache. La viscosité est inversement proportionnelle à la température. La viscosité du lait de chèvre serait plus basse que celle du lait de vache et de brebis. L'acidité titrable d'un lait varie en fonction de l'évolution de la teneur en protéines du lait et varie selon certains auteurs selon la saison. Ainsi, la valeur de 16° D est celle d'un lait de chèvre acide contre 18° D pour un lait de vache (Debry, 2001).

2/ Composition du lait

Le lait est une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous la forme colloïdale (Vignola et al., 2002).

D'un point de vu quantitatif, le lait se compose d'éléments majeurs et d'éléments moins abondants, dont beaucoup sont non dosables .

Comme composants majeurs : l'eau, la matière grasse, le lactose, les protéines et les matières salines. Et comme éléments mineurs : les vitamines, les oligo-éléments, les gaz dissous, la lécithine, les enzymes et les nucléotides. Certains d'entre eux jouent un rôle en raison de leur activité biologique.

Cette composition varie selon différents facteurs liés à l'animal. Les principaux étant l'individualité, la race, l'âge et l'espèce, la période de lactation, la saison et enfin l'alimentation. Le tableau 2 montre la composition en éléments des laits de vache, de chèvre et de brebis.

Tableau 2 : Composition du lait de vache, de chèvre et de brebis.

En g/Kg des différents laits	Extrait sec total	Matières grasses	Matières azotées	lactose	cendres
Lait de vache	125	37	33	47	8
Lait de chèvre	120	35	31	46	7 – 9
Lait de brebis	190	75	60	45	10

Source : (Debry, 2001).

2.1/ Les éléments de composition des différents laits

♦ L'eau :

Pondéralement, l'eau est le composant le plus important du lait, il représente environ les 9/10 du lait, les autres éléments constituent la matière sèche totale, qui est plus importante chez le lait de brebis que ceux de laits de vache et de chèvre (Vignola et *al.*, 2002).

♦ La matière grasse :

La matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras émulsionnée dans la phase aqueuse et dont la dimension varie selon l'espèce, la race, et la période de lactation (Vignola et *al.*, 2002).

Dans les produits laitiers, les matières grasses jouent un rôle important, elles contribuent à la saveur et à la microstructure d'un fromage. Moins il y a de gras, plus la structure du fromage est ferme (St-Gelais et *al.*, 1999). La matière grasse dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage, constitue l'un des éléments majeurs du lait. Ainsi, on note que le lait de brebis est nettement plus riche en lipides que le lait de vache et de chèvre (Wolff et Fabien, 1998).

En technologie, il est plus facile d'homogénéiser un lait quand les globules gras qu'il contient sont plus petits. La matière grasse du lait de chèvre et de brebis semble plus digestible que celle du lait de vache, du fait que la taille moyenne des globules du lait de chèvre, de brebis sont légèrement inférieures à celle du lait de vache, respectivement : 1,99, 1,99 et 3,53 μ (Wolff et Fabien, 1998). D'autre part, la richesse de la matière grasse en acides gras à chaînes courtes et moyennes en fait aussi une matière grasse très digestible.

La distribution de ces divers constituants lipidiques est très similaire dans les laits de vache et de chèvre (FAO, 1990). En ce qui concerne les particularités, il y a lieu de noter dans le lait de chèvre la présence, plus importante que dans le lait de vache, des acides gras à courtes et moyennes chaînes (6 à 12 carbones), ces derniers représentent près de 20 % dans le lait de chèvre, alors que la matière grasse du lait de vache en contient de 10 à 20 % d'acides gras de cette catégorie (FAO, 1990).

La lipoprotéine-lipase du lait de vache est répartie pour environ 5 à 30 % dans la phase grasse, contre 48 % dans le lait de chèvre. Dans les micelles de caséine, la proportion de lipoprotéine-lipase semble être plus faible : 8 % contre 77 % chez la vache (Vignola et al., 2002).

♦ La matière azotée

Le lait comprend deux groupes de matières azotées : les protéines et les matières azotées non protéique ; respectivement 95 % et 5 % de l'azote minéral du lait de vache (Vignola et al., 2002).

La matière azotée ou taux protéique est la quantité de matière azotée totale exprimée en g/Kg ou litre de lait, obtenue en multipliant par la teneur en azote du lait (g/Kg ou litre de lait), déterminée par la méthode Kjeldahl. Les teneurs en protéines totales sont voisines dans les laits de vache et de chèvre. Elles sont, en moyenne, plus élevées dans le lait de brebis (tableau 3).

Tableau 3 : La composition moyenne en protéines en (g/litre) et leur distribution dans les laits de vache, de chèvre et de brebis.

Protéines	Vache	Chèvre	Brebis
α - lactalbumine	1,5 (45 %)	2,0 (25 %)	1,3 (10 %)
β - lactoglobuline	2,7 (25 %)	4,4 (55 %)	8,4 (67 %)
Albumine sérique	0,3 (5 %)	0,6 (7 %)	0,6 (5 %)
Immunoglobulines	0,7 (12 %)	0,5 (6 %)	2,3 (18 %)
Protéase – peptone	0,8 (13 %)	0,6 (7 %)	
Total des protéines solubles (100 %)	6,0 (100 %)	8,10 (100 %)	12,6 (100 %)
Caséine α_s	12,0 (46 %)	19,2 %	21,0 (47 %)
Caséine β	9,0 (36 %)	54,8 %	16,1 (36 %)
Caséine K	3,5 (13 %)	20,4 %	4,5 (10 %)
Caséine γ	1,5 (6 %)	18,3 %	3,0 (6 %)
Total des caséines (100 %)	26,0 (100 %)	26,0 (100 %)	44,6 (100 %)
Protides totaux	32,0	34,1	57,2

Source : FAO, (1990).

Le profil en acides aminés totaux du lait de chèvre est proche de celui du lait humain et les acides aminés essentiels s'y trouvent en excès relatif par rapport aux besoins du nourrisson (Brûlé et *al.*, 1997). Par comparaison au lait de vache, les protéines du lait de chèvre contiennent proportionnellement moins de caséines et d'avantage d'azote non protéique qui peut être calculé en multipliant l'azote non protéique par 6,39 (FAO, 1990).

Le lait de chèvre présente proportionnellement deux fois moins de caséines α_s (1 – 2), et plus de caséines β et κ que le lait de vache. Ce qui explique l'apparition moins fréquente du goût d'amertume sur les fromages de chèvre. Comme chez la vache, la bêta -lactoglobuline constitue la protéine majeure du lactosérum du lait de chèvre. Les compositions aminées de la bêta- lactoglobuline et l' α - lactalbumine sont plus élevées dans le lait de chèvre que dans le lait de vache. La richesse du lait de brebis en protéines sériques est surtout marquée par une teneur élevée de la bêta- lactoglobuline et des immunoglobulines (Daviau et *al.*, 2000). Les laits de chèvre et de brebis coagulent plus vite et donnent des coagulums plus fermes que le lait de vache. C'est pourquoi ils sont très utilisés en fromagerie (FAO, 1990).

♦ *Le lactose*

Le lait doit sa saveur douce à la présence du lactose ou sucre du lait, $C_{12}H_{22}O_{11}$, diholoside formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose (Raynal et Remeuf, 2000).

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique à partir du lactose, ce qui entraîne un abaissement du pH du lait indispensable pour obtenir soit la coagulation en fabrication des fromages frais, soit son acidification préalable avant coagulation enzymatique pour la fabrication des fromages affinés. Sa teneur varie en fonction de la lactation, et elle est presque identique pour le lait chèvre et de vache. Dissous dans la phase liquide, le lactose sera en grande partie entraîné par le sérum sous forme d'acide lactique au cours de l'égouttage du caillé.

♦ *La fraction vitaminique*

Le lait apporte un complément vitaminique important dans une ration alimentaire car il contient, en concentrations élevées, une grande variété de vitamines ou de provitamines, aussi bien liposolubles (A, D, E, K) qu'hydrosolubles (B, C) d'où son intérêt vitaminique (FAO, 1990). La teneur en vitamines des trois différents laits est donnée par le tableau 4.

La teneur en vitamines est fonction de plusieurs facteurs : l'alimentation, la race, la saison, l'état physiologique de l'animal, le niveau de lactation et enfin la méthode d'analyse. Le lait de brebis est plus riche, dans presque toutes les vitamines, par rapport au lait de vache et de chèvre. Le lait de chèvre contient moins d'acide folique (vitamine B_9) et vitamine B_{12} que le lait de vache mais est plus riche en vitamine PP. Une faible teneur en folate dans le lait de chèvre serait à l'origine des anémies

mégalo-blastiques observées chez des nourrissons ou des jeunes enfants principalement alimentés au lait de chèvre. En plus cette vitamine est une substance nécessaire à la croissance des *Leuconostocs* dans le lait (FAO, 1990).

Tableau 4 : Teneurs en vitamines des laits de diverses espèces animales (mg/litre).

Vitamines	Vache	Chèvre	Brebis
B ₁	0,42	0,41	0,85
B ₂	1,72	1,38	3,30
B ₆	0,48	0,60	0,75
B ₁₂	0,0045	0,0008	0,006
Acide nicotinique	0,92	3,28	4,28
Acide folique	0,053	0,006	0,006
C	18	4,20	47,0
A	0,37	0,24	0,83
β -carotène	0,21	< 0,10	0,02

Source : FAO, (2002).

Note : Les valeurs exprimées sont des valeurs moyennes ou, dans quelques cas, des valeurs extrêmes.

◆ Les éléments minéraux

Une vue d'ensemble de la composition minérale du lait de chèvre, de vache et de brebis est donnée dans le tableau 5.

La fraction minérale, bien que mineure dans la composition du lait, joue un rôle essentiel d'un point de vue nutritionnel et technologique (Vignola *et al.*, 2002). Le lait de brebis est nettement plus riche en calcium et phosphore que les laits de vache et de chèvre. La teneur en chlorure dans le lait de chèvre est élevée et est à l'origine d'acidoses hyperchlorémiques observées chez les nourrissons exclusivement alimentés au lait de chèvre (FAO, 1990).

Tableau 5 : Teneurs en éléments minéraux des laits de vache, de chèvre et de brebis.

Minéraux mg /litre	Vache	Chèvre	Brebis
Calcium	1250	1350	1900
Phosphore	950	1000	1500
Magnésium	120	180	160
Potassium	1500	1800	1250
Sodium	520	400	450
Fer	0,2 à 0,5	0,1	0,5 à 0,7
Chlore	1,00	2,20	1,21

Source : FAO, (2002).

3/ Systèmes enzymatiques naturels du lait

Dans les conditions normales, le lait contient une grande variété d'enzymes (tableau 6).

Il y a plus de 100 ans, on mentionnera pour la première fois la présence de la lactoperoxydase, probablement la première enzyme découverte dans le lait de vache par Arnold 1881 (Debry, 2001).

Depuis plus de 60 enzymes ont été répertoriées, mais toutes ne proviennent pas de cellules lactogènes ou des leucocytes et ne sont pas des constituants natifs. De nombreuses enzymes sont produites par les micro-organismes du lait. C'est la raison pour laquelle on distingue parfois entre :

- *Les enzymes natives dites encore naturelles ou intrinsèques.*
- *Les enzymes d'origine externe, celles des micro-organismes, ou extrinsèques.*

Tableau 6: Quelques unes des enzymes du lait

Nom	Répartition	pH optimum	Masse molaire en g.mol ⁻¹	Teneur en mg.l ⁻¹
1-oxdoréductases				
Lactopéroxydase	Lactosérum	6,5 – 6,8	Environ 80000	10 –70
Xanthine oxydase	Membrane globulaire	7	600000	120-160
Catalase	Membrane globulaire	6,8 – 7,00	240 000	
2- Hydrolases				
Phosphatase alcaline	Membrane globulaire	7 – 10	170 000	
Lysozyme	Lactosérum	8	14 000-18 000	0,01 – 0,18
Lipase naturelle	Caséine	7 – 9	50 000	1 - 2
Protéase alcaline	Caséine	7,5 – 8	48 000	
Protéase acide	Caséine	4	36 000	

Source : Debry, (2001).

4/ Substances antibactériennes du lait

De nombreuses expériences ont montré que le lait possède des propriétés bactéricides ou bactériostatiques vis à vis de nombreux micro-organismes de contamination : bactéries pathogènes, bactéries lactiques (Bourgeois et *al.*, 1996).

On distingue ainsi les systèmes d'inhibition suivants :

4.1 / Lactoperoxydase-thiocyanate

C'est une enzyme qui est présente dans tous les laits à une teneur moyenne de 30 mg/litre (Gautier et *al.*, 1999). C'est l'une des substances responsables des propriétés antibactériennes du lait cru ; elle est à l'origine de la période bactériostatique, d'une durée de quelques heures, qui suit la traite.

L'enzyme a été obtenu à l'état cristallisé. Il s'agit d'une porphyrine riche en fer. Son pH optimal d'action est de 6,8. Elle catalyse en présence d'eau oxygénée l'oxydation du thiocyanate, en donnant un système lactoperoxydase-H₂O₂- thiocyanate qui inhibe temporairement quelques Streptocoques et tue d'autres (Le Graet et Brule, 1993).

De son côté, la lactoperoxydase est détruite par chauffage à 82 °C pendant 20 secondes. Il n'est pas rentable d'utiliser comme levain de fromagerie des souches de bactéries lactiques sensibles au système lactoperoxydase-H₂O₂- thiocyanate.

4.2/ Les agglutinines

Ces dernières appelées autrefois lacténines (L₁ et L₃) appartenant au groupe des immunoglobulines, sont des anticorps, synthétisés par les lymphocytes, qui pénètrent dans les cellules lactogènes pour finalement entrer dans la composition du lait, en réponse à la présence dans l'organisme d'antigènes en particulier de certains constituants microbiens. Elles sont capables d'agglomérer des spores et les bactéries qui leur sont sensibles voire de retenir leur amas dans les grappes de globules gras (Debry, 2001). L'effet inhibiteur des immunoglobulines sera donc plus prononcé dans le lait entier que le lait écrémé. Elles sont inactivées à 82 °C pendant 20 secondes.

4.3/ Le lysozyme

Le lysozyme est une glycohydrolase qui catalyse l'hydrolyse de peptidoglycane constituant la paroi des bactéries et ce faisant entraîne leur destruction. C'est une protéine basique stable à pH acide même à température relativement élevée (Bergere, 1984). Le lysozyme est important grâce à son rôle immunologique dans la conservation de la qualité d'un lait par ses propriétés bactériologiques (St-Gelais et Savoie, 1993).

5/ Qualité bactériologique du lait

A la sortie de la mamelle, après une traite stérile, le lait possède une flore microbienne peu nombreuse (De 10^1 à 10^5 germes totaux par ml). C'est au cours des opérations de récolte et de conservation du lait à la ferme que cette flore peut s'accroître par multiplication et contamination de certains micro-organismes (Juillard et *al.*, 1987).

Les bactéries sont les espèces les plus importantes sur les plans technologique et hygiénique, un lait qui contient 10^7 germes totaux /ml est acidifié et difficile à travailler ; il est souhaitable qu'il n'abrite pas plus de 5×10^5 germes totaux /ml à l'arrivée à l'usine.

On répartit les micro-organismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminante (Champagne et *al.*, 2000).

➤ *Flore originelle*

La flore originelle ou indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces micro-organismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs.

La majorité des germes est constituée de souches banales, dont la présence, en quantité limitée, n'est pas gênante et est même utile. Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : *microcoques* mais aussi *Streptocoques lactiques* et *lactobacilles* (Vignola et *al.*, 2002).

La composition en microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives est donnée dans le tableau 7.

Tableau 7: Flore originelle du lait cru

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30 – 90
<i>Lactobacillus</i>	10 – 30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
<i>Gram négatif</i>	< 10

Source : Champagne et *al.*, (2000).

➤ *Flore contaminante* : La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation (Guiraud, 1998). Elle peut se composer d'une :

- ◆ *Flore d'altération* : Qui causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme et d'apparence ou de texture et réduira la durée de conservation des produits laitiers. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un

n'exclut pas l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont : *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, les coliformes, soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulés telles que *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, et certaines levures et moisissures (St-Gelais et *al.*, 1999).

- ◆ **Flore pathogène** : Dont la présence dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme (Guiraud, 1998). Capable de provoquer des maladies chez les personnes qui consomment ces produits laitiers contaminés. Il peut s'agir d'agents de mammites (*Streptocoques pyogènes*, *Corynebactéries pyogènes*, Staphylocoques) ou de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalie du pis : *Brucella*, *Bacillus anthracis* et quelques virus (Wattiau, 2000).

6/ Influence de la nature du lait sur la croissance et l'activité des bactéries lactiques

Les laits de vache, de chèvre et de brebis ont des compositions différentes. Ceci a des conséquences sur leurs propriétés physico-chimiques et l'aptitude des bactéries lactiques à croître dans ces laits.

Les études ont montré que les laits de brebis se distinguent des deux autres laits par une richesse supérieure en matières grasses, en caséine α_s et β et en minéraux (calcium et phosphore). Ses teneurs importantes en protéines et minéraux lui confèrent un pouvoir tampon élevé.

Etant donné les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1994), ces différences entre les laits vont avoir des conséquences sur la croissance et l'activité (production de métabolites) de ces micro-organismes dans le lait.

Ainsi, du fait de son activité immunologique et de son pouvoir tampon élevé, le lait de brebis possède, pendant les quelques heures après la traite, une résistance vis à vis d'éventuelles contaminations bactériennes (FAO, 1990). Les travaux de Bassit et *al.*, (1995) ont par contre montré, que sur les laits stérilisés à basse température, *Lc. lactis ssp. lactis* se développe plus vite et produit d'avantage d'acide sur lait de brebis que sur lait de vache tandis que sur des laits pasteurisés *Lc. lactis ssp lactis* acidifie plus rapidement le lait de chèvre que le lait de brebis

Enfin, plusieurs travaux comme ceux de Champagne et Lange, (1992) ont montré un développement des bactéries lactiques aussi important et une production d'acide lactique comparable sur laits de chèvre et de vache.

Chapitre 2 : LES BACTERIES LACTIQUES

1/ Généralités sur les bactéries lactiques

On appelle bactéries lactiques des microorganismes assez hétérogènes sur les plans morphologie et physiologie qui se caractérisent par une production de quantités importantes d'acide lactique résultant du métabolisme des glucides (Desmazeaud, 1983).

Ce sont des cocci ou des bâtonnets à Gram positive, immobiles, asporogènes, non pigmentées, anaérobies mais aérotolérantes, ne possédant ni catalase, ni nitrite réductase, ni cytochrome oxydase, à l'exception de quelques souches qui possèdent une pseudocatalase et peuvent apparaître catalases positives (Deroissart, 1986 ; Guiraud, 1998).

Elles ne produisent pas d'indole, ni de sulfure d'hydrogène et ne léquifient pas la gélatine, seulement quelques espèces sont faiblement caséolytiques. Aucune souche des bactéries lactiques ne peut produire des acides volatils de plus de deux atomes de carbones (Deroissart et Luquet, 1994).

Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, on parle de bactéries homofermentaires (si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé) ou hétérofermentaires si d'autres produits sont aussi présent : acide lactique, éthanol, CO₂ (Dellaglio, 1988).

1.1/ Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été isolées de nombreux milieux naturels : végétaux (plantes et fruits), animaux et humains (cavité buccale et vaginale, fèces, laits,...). Certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (Deroissart, 1986).

Les espèces du genre *Streptococcus* se rencontrent surtout chez l'homme, les animaux et les oiseaux. Elles sont pour la plupart saprophytes mais certaines ont un caractère pathogène (Deroissart et Luquet, 1994).

Les espèces du genre *Lactobacillus* se rencontrent plus couramment dans la nature associée aux plantes, aux animaux et à l'homme. Peu d'espèces ont un caractère pathogène.

Les espèces du genre *Pediococcus* ne se retrouvent pratiquement que sur les plantes.

Les bactéries lactiques sont souvent associées à d'autres microorganismes dans de nombreux produits de fermentation naturelle : laits et viandes fermentés, boissons alcoolisées à base de fruits, fourrages fermentés (ensilages) (Desmazeaud, 1983).

1.2 / Taxonomie des bactéries lactiques

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière (Doleyres, 2003).

Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les sales à ferments des industries laitières (Champagne, 1998).

La différenciation entre genres se fait généralement par l'examen microscopique et par le test de fermentation de Gibsson et Abdel Malek.

La différenciation entre espèces repose d'abord sur la spécificité relative de leurs caractères physiologiques. Les tests les plus couramment appliqués sont l'aptitude à fermenter les sucres, les recherches de réductase et d'arginine dihydrolase, les déterminations des températures de croissance, de thermorésistance et de tolérance aux sels.

La différenciation entre biotypes ou souches d'une même espèce s'appuie sur un ensemble de caractères tels que les degrés de résistance aux inhibiteurs : bactériophages, antibiotiques, lacténines, agglutinines ainsi que les aptitudes acidifiantes, aromatisantes, protéolytiques et enfin gazogènes (Buchanan et Gibbons, 1974). Le tableau 8 montre les principales différences entre les genres des bactéries lactiques.

Tableau 8 : Quelques caractéristiques des principales espèces de bactéries lactiques

Genre	Principales espèces ou sous-espèces	Fermentation	Isomère de l'acide lactique	Température de croissance	Type respiratoire	Produits finaux de fermentation	Source
Lactococcus	<i>Lactis ssp. lactis</i> <i>Lactis ssp. cremoris</i> <i>Lactis ssp. lactis biovar Diacetylactis</i>	Homolactique	L (+)	10 – 40 °C 10 – 37°C 10 – 40°C	Anaérobie facultatif	Acide lactique	Leveau et al., (1991)
Streptococcus	<i>Thermophilus</i>	Homolactique	L (+)	40 – 45 °C		Acide lactique	
Leuconostoc	<i>Mesenterpides ssp.</i> <i>Cremoris</i> <i>Oenos</i>	Hétérolactique (O)	D (-)	10 – 37°C 12 – 37°C		Acide lactique, éthanol, acide acétique et CO ₂	
Pediococcus	<i>Pentosaceus</i> <i>Acidilactis</i>	Homolactique	DL	25 – 35°C 35 – 50°C	Microaérophile	Acide lactique	
Lactobacillus	<i>Delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Delbreuckii ssp. lactis</i> <i>Helveticus</i> <i>Acidophilus</i>	Hémolactique	D (-) D (-) DL DL	45 – 50 °C 45 – 50°C 45 – 50 °C 35 – 45°C		Acide lactique	
	<i>Casei ssp. casei</i> <i>Casei ssp. rhamnosus</i> <i>Plantarum</i> <i>Sake</i> <i>Curvatus</i> <i>Brevis</i>	Hétérolactique (F)	L (+) L (+) DL DL DL DL	15 – 40 °C 15 – 45°C 10 – 40°C 05 – 40 °C 05 – 40°C 15 – 40°C		Acide lactique, éthanol, acide acétique et CO ₂	
Bifidobacterium	<i>Bifidum Longum</i> <i>Infantis</i> <i>Breve</i> <i>Adolescentis</i>	Acétique et lactique	L (+)	37 – 41°C	Anaérobie	Acides acétiques, lactiques, formiques et succiniques. Ethanol	

O : Obligatoire ; F : Facultatif ; L : Lévoxyre ; D : Dextroxyre

2/ Les ferments lactiques

2.1 Définition et rôle des ferments lactiques

Des bactéries lactiques sont aujourd'hui utilisées en industrie sous forme de ferments pour la fabrication de produits fermentés.

Elles remplacent la flore acidifiante naturelle du lait détruit par thermisation ou pasteurisation et qui en se multipliant dans le lait et dans les fromages assurent deux fonctions essentielles :

- Abaisser le pH en transformant le lactose en acide lactique (homofermentation), ou en acide lactique, acide acétique et éthanol (hétérofermentation). Cette acidification intervient comme facteur de la coagulation du lait et de la synérèse des caillés (Accolas, 1980 ; Loones, 1994).
- Contribuer aux caractères organoléptiques des fromages en libérant des systèmes enzymatiques qui participent aux principaux phénomènes de l'affinage des caillés (Hermier et *al.*, 1992).

2.2 Composition des ferments lactiques

Selon leur température optimale de croissance, les bactéries lactiques sont divisées en groupe mésophiles et thermophiles (Doleyres, 2003).

- **Flore mésophile :** Cette flore mésophile englobe les lactocoques homofermentaires, les *leuconostocs* et certains lactobacilles (tableau 9). Les principales propriétés des bactéries de ce groupe mésophile sont consignées dans le tableau 10.

Tableau 9 : flore lactique mésophile.

Streptocoques homofermentaires		Streptocoques hétérofermentaires	
Désignation actuelle :	Antérieure :	Désignation actuelle :	Antérieure :
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteoides</i>	<i>Leuc. cremoris</i>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i>	<i>Sc. cremoris</i>	<i>ssp. cremoris</i>	
<i>L. lactis ssp. diacetylactis</i>	<i>Sc. diacetylactis</i>	<i>Leuc. mesenteroides ssp. dextranicum</i>	<i>Leuc. dextranicum</i>
		<i>Leuc. lactis</i>	<i>Leuc. citovororum</i>

Source : Dupuy, (2004).

Tableau 10 : Propriétés des principales bactéries lactiques mésophiles

espèces	<i>Lactococcus lactis ssp.</i>			<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.</i>	
	<i>Lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>mesenteroides</i>
Fermentation lactique	Homofermentaire			Hétérofermentaire	
Configuration du lactate	L+			D-	D-
Acidité produite	45 °SH			25°SH	
Vitesse d'acidification	Rapide			Lente	
Température de croissance	20 - 30°C			20-30°C	
Fermentation du citrate	non		oui		
Pouvoir de protéolyse	faible				

Source : Dupuy, (2004).

- **Flore thermophile**

La composition des levains naturels utilisés pour la fabrication de différents types de fromages est variable et non précise (Dupuy, 2004). Les levains sélectionnés sont, eux définis et contiennent plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* utilisées en particuliers dans la fabrication de fromage à pâte cuites (Tableau 11).

Tableau 11 : Flore thermophile

Streptocoques et lactobacilles homofermentaires	Lactobacilles hétéro-fermentaires facultatifs	Lactobacilles hétéro-fermentaires strictes
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>Lb. casei ssp. casei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Sc. salivarius ssp. thermophilus</i>		

Source : Dupuy, (2004).

2.3/ Critères de sélection de souches pour l'élaboration de ferments

Cette sélection s'effectue selon des critères technologiques, les principales fonctions des ferments étant la production d'acide, de gaz et d'arômes, la protéolyse, la lipolyse et l'inhibition de

bactéries indésirables (Stadhouders, 1974). La caractérisation technologique se fait donc sur les critères suivants :

2-3-1 Activité acidifiante

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

- La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé ;
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final ;
- L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Doleyres, 2003).

2-3-2 Production de composants d'arômes et de gaz

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoléptiques des fromages. La plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (Doleyres, 2003).

2-3-3 Activité protéolytique

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Larpen, 1987).

2-3-4 Résistance aux bactériophages

Les phages sont des parasites obligatoires. Ils constituent l'une des principales causes de perturbation de l'acidification du lait par les bactéries lactiques. Il est nécessaire que les bactéries lactiques composant les ferments ne soient pas toutes sensibles aux mêmes phages pour diminuer les risques d'accidents de fabrication.

Un autre risque lié aux phages est la lysogénie. Une souche est dite lysogène lorsqu'elle héberge en son génome un phage tempéré inactif appelé prophage. Ainsi, la lysogénie, qui est un mécanisme fréquent (Reyrolle et al, 1982), est potentiellement dangereuse. Il est important d'examiner les souches de ce point de vue et de détecter celles qui sont lysogènes en provoquant artificiellement l'induction des prophages par rayons UV ou par la mitomycine C (Aubert, 1998).

2-3-5 Activité bactériostatique : production de bactériocines

Les bactériocines, telles que la nisine ou la pédiocine, sont des molécules de nature protéique dont l'action bactériostatique est spécifique de quelques espèces bactériennes (Tagg et al, 1976). Ces substances, élaborées par certaines bactéries lactiques, inhibent la croissance de différentes souches de

bactéries pathogènes (*Listeria* et *Clostridium*), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptiques du fromage (Hamon, 1964 ; Lachance, 2000).

2-3-6 Résistance aux antibiotiques

La présence d'antibiotiques dans les laits (pénicilline, vancomycine, etc) peut être due au traitement des mammites. La plupart des bactéries y sont sensibles.

Il n'est pas souhaitable de sélectionner, dans la composition des ferments, des souches résistantes aux antibiotiques, car ingérées par l'homme, elles sont susceptibles de transférer ces caractères aux autres bactéries du tube digestif. De plus, l'augmentation de l'ingestion d'antibiotiques par l'homme peut entraîner des risques d'allergie. Enfin, des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent avoir, en plus, perdu certaines de leurs caractéristiques originelles.

2-3-7 Production d'amines biogènes

Différentes souches de bactéries lactiques sont soupçonnées d'être à l'origine de la formation d'amines biogènes (Gonzalez et al.,1998) dans les fromages. Les systèmes enzymatiques de ces bactéries sont capables de décarboxyler des acides aminés (histidine, tyrosine, etc.) et de former des composés (histamine, tyramine, etc.) à l'origine d'allergie s'ils sont consommés en quantités importantes.

3/ Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fabrication de divers aliments fermentés, des boissons et des produits alimentaires (Leroy et Devuyst, 2004). En plus, certaines souches de bactéries lactiques, notamment les souches du genre, *Lactobacillus*, sont de plus en plus marquées comme étant des facteurs de promotion de la santé, c'est à dire des bactéries probiotiques (Saxelin et al., 2005), pendant que certaines souches de *Lactobacillus* produisent des peptides bioactifs qui ont un effet bénéfiques sur la santé à partir des protéines du lait (Korhonen et Pihlanto, 2003).

Une autre avenue prometteuse des bactéries lactiques est de les utiliser comme transporteurs des molécules qui ont une valeur thérapeutiques (Nouaille et al., 2003)

Cependant, l'application la plus importante des bactéries lactiques est, sans doute, leur utilisation comme ferments dans la fabrication de divers produits laitiers fermentés. En particulier, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* sont largement utilisées dans les ferments laitiers et ont une importance économique majeure.

Chapitre 3 : LES LACTOCOQUES

1/ Généralités sur les lactocoques

Les lactocoques sont des bactéries lactiques mésophiles appartenant à la famille des *Streptococaceae*. Les lactocoques se présentent sous forme de coques (habituellement de 1 µm de diamètre), qu'on trouve isolées en paires ou en chaînettes de longueur variable (Desmazeaud, 1996). Ce sont des organismes homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique L (+), anaérobies facultatifs ou microaérophiles, catalase négative (Dellaglio, 1994).

Leurs propriétés communes sont : leur caractère non pathogène, la présence de l'antigène de groupe N, l'absence d'hémolyse β mais parfois la présence d'une hémolyse α, une croissance optimale à température moyenne : de 20 à 30 °C et une température minimale au moins égale à 10 °C, une faible thermorésistance : leur viabilité est perdue après 30 minutes d'exposition à 63 °C (Deroissart, 1986).

La distinction entre espèces et sous - espèces de *Lactococcus* est donnée dans le tableau 12.

Tableau 12: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques.

	<i>Lactococcus. lactis</i> <i>subsp cremoris</i>	<i>Lactococcus. lactis</i> <i>Subsp lactis</i>	<i>Lactococcus. lactis</i> <i>subsp lactis biovar</i> <i>diacetylactis</i>
Groupe sérologique	N	N	N
GC %	39-40	39-40	39-40
Hémolyse	γ	γ	γ
Type Fermentaire	Homo	Homo	Homo
Croissance à :			
10°C	+	+	+
30°C	+	+	+
45°C	-	-	-
Croissance en présence de NaCl :			
2%	+	+	+
4%	-	+	+
6,5%	-	-	-
Croissance à pH 9,6	+	-	+
Milieu bilié	-	-	-
Résistance 30 min à 63 °C	V	v	v
LS	+	v	+
Hydrolyse de l'arginine	+	-	+
Résistance au tellurite	.	.	.
LT	ARC	ARC	ARC
Fermentation du citrate	-	-	+
Acétoïne	+	-	-
Gélatinase	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-
CO ₂ sur citrate	+	-	-
Sucres fermentés :			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Saccharose	-	+/-	+/-
Maltose	-	+	+
Pentoses	-	+/-	+/-
Mannitol	-	+/-	+/-
Mélibiose	-	-	-

Source : Guiraud, (1998).

Symboles :

+ : Positive pour la plupart des souches

v : variable

A : acidification

R : réduction

C : coagulation

. : Non déterminé

LT : Lait tournesolé.

LS : Lait de Sherman

1.1/ Classification et nomenclature

Traditionnellement, les Streptocoques lactiques mésophiles ont été rattachés au genre *Streptococcus*. Récemment, Schleifer et al. (1985), se fondant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les Streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. Ce nouveau genre regroupe plusieurs espèces et sous-espèces dont les plus importantes sont (Dupuy, 2004) :

- *Lactococcus lactis subsp. lactis* ;
- *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* ;
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

Streptococcus lactis, *Streptococcus cremoris* sont essentiellement acidifiantes. *Streptococcus diacetylactis* est aromatisante (synthèse du diacétyl) (Aubert, 1998).

1.2/ Habitat des lactocoques

Les lactocoques peuvent être isolés des produits végétaux qui constituent probablement leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Novel, 1993).

Ainsi, *Lactococcus lactis subsp. Lactis* fut isoler pour la première fois par Lister en 1873 du lait fermenté et de ce fait reconnu comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Sandine, 1988). Il est facilement isolé du lait cru mais peut l'être d'autres habitats en particulier des végétaux ; on le trouve aussi dans la flore minoritaire du rumen (10^4 cellules par gramme).

L'ancienne sous espèce *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* serait plus liée aux végétaux (Collins et Gibson, 1999).

Lactococcus lactis subsp. cremoris serait plus exclusivement adapté au lait. Mais son isolement est plus difficile, sa concentration y étant faible (Sandine, 1985).

1.3/ Exigences nutritionnelles

Les lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique ce qui explique leur polyauxotrophie pour plusieurs molécules intermédiaires. Elles requièrent non seulement des substances complexes carbonées, azotées, phosphatées et soufrées mais aussi de très nombreux facteurs de croissance sont nécessaires à leur multiplication en particulier des acides aminés et des vitamines du groupe B (Konning, 1994). C'est la raison pour laquelle leur abondance dans un milieu aussi riche que le lait.

Les besoins nutritionnels des lactocoques sont résumés dans le tableau 13

Les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés et doivent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme. Les acides aminés peuvent être

apportés dans le milieu sous forme chimique pure ou alors sous forme de produits d'hydrolyse de la caseine (Konnings, 1996).

Jensen et Hammer (1993) ont remarqué qu'il y avait une stimulation de la croissance des lactocoques dans un milieu (SA) contenant 19 acides aminés. En effet, le taux de croissance spécifique passait de $0,3 \text{ h}^{-1}$ à $0,7 \text{ h}^{-1}$.

Cocaign-Bousquet et al. (1995) ont défini un milieu minimum (MS 13) contenant six acides aminés essentiels (glutamine, valine, méthionine, histidine, leucine et isoleucine). Ils ont noté la croissance en dépit de l'absence d'oligo-éléments et de bases nucléiques. Cependant l'utilisation d'acides aminés sous forme pure est fastidieuse et coûteuse. C'est pourquoi on a recours à la caséine. 90 % des différentes sources d'azotes contenues dans le lait et qui contribuent à la croissance de *Lactococcus lactis* sont des oligopeptides issues de l'hydrolyse de la caséine par les enzymes protéolytiques se trouvant au niveau de l'enveloppe cellulaire (Juillard et al., 1995 ; Guedon et al., 2001). Cependant, la caséine reste toujours insuffisante ; il faut toujours ajouter de l'extrait de levure.

Les vitamines du groupe B sont essentielles pour la croissance des bactéries lactiques. Différentes études ont montré que la nicotinate, le pentothénate et la biotine sont vitales (Cocaign-Bousquet et al., 1995). Ces auteurs ont montré que la biotine n'est pas nécessaire si le tween 80 est présent dans le milieu de culture.

Il a été montré que les ions Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Se^{4+} pouvaient intervenir dans la nutrition des bactéries lactiques mésophiles.

En revanche, les acides nucléiques ne sont pas essentiels à la croissance cellulaire mais ils possèdent un effet stimulateur. En effet, Cocaign-Bousquet et al. (1995) ont noté que lorsqu'on apporte dans le milieu des acides nucléiques le taux de croissance augmente de 35 %.

Ces besoins nutritionnels particulièrement spécifiques expliquent les nombreux phénomènes d'associations constatés chez les bactéries lactiques. Ils expliquent également l'amélioration de leur développement sur lait à la suite de certains traitements technologiques comme la maturation ou le chauffage.

Tableau 13 : Besoins nutritionnels des lactocoques

Substances de croissance	<i>Lc. lactis subsp. lactis</i>	<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i>	<i>Lc.lactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i>
Acides aminés			
Lysine	-	-	-
Leucine	+	+	+
Histidine	+	+	+
Valine	+	+	+
Cystéine	S	+	S
Aspartate	nd	nd	nd
Glutamate	+	+	+
Isoleucine	+	+	+
Tyrosine	nd	nd	nd
Méthionine	+	+	+
Vitamines			
Vit. B ₁₂	+	+	+
Biotine	+	+	+
Niacine	+	+	+
Panthothécrate	+	+	+
Riboflavine	+	+	+
Thiamine	+	+	+
Pyridaxol	+	+	+
Acide folique	+	+	+
Acides organiques			
Acide acétique	+	+	+
Acide oléique	nd	nd	nd
Acide orotique	nd	nd	nd
Acide formique			
Acides nucléiques			
Hypoxanthine	S	-	-
Adénine	S	S	-
Guanine	S	-	-
Thymine	S	-	-
Thymidine	S	-	-
Uracile			

Source : Konnings, (1994).

Symboles :

+ : Essentiel à la croissance, - : Non requise pour la croissance, S : Stimulant, nd : Non déterminé.

2/ Biochimie des lactocoques

2.1/ Métabolisme des sucres

La fermentation des sucres par les bactéries lactiques aboutit principalement à la production d'ATP (nécessaire à leur croissance et à leur reproduction) et de lactate qui en s'accumulant dans le milieu, ralentit le métabolisme jusqu'à l'arrêter complètement (Luquet, 1986).

La figure 1 présente les différentes voies métaboliques utilisées par *Lactococcus lactis sp* pour l'utilisation du lactose.

La plupart des sucres pénètrent dans le cytoplasme grâce au système de transport phosphoénolpyruvate (PEP/PTS) ou via la perméase. Chez *Lactococcus lactis sp*, la part de chaque système de transport n'est pas connue (Poolman et al., 1989).

Les souches de *Lactococcus lactis sp* suivent principalement une voie homofermentaire dans laquelle 90 à 95 % des sucres consommés sont convertis en acide lactique, lorsque la glycolyse se déroule de façon optimale.

Cependant, sous certaines conditions de fermentation et pour quelques souches de *Lc. lactis sp*, une partie du pyruvate peut dévier de la voie centrale de la glycolyse et être à l'origine de la formation de divers composés : acétaldéhyde, éthanol, acétate et formate (Thoma et Crow, 1984 ; Poolman et al., 1989).

Les *Lc. lactis sp* sont généralement associées à une forte capacité d'acidification du lait. Cependant plusieurs souches appartenant à cette espèce ne produisent que de faibles quantités d'acides. L'opéron lactose contenant les gènes intervenant dans le transport et une partie du métabolisme du lactose est souvent porté par un plasmide chez *Lactococcus lactis sp*. La perte de ces gènes rend les souches incapables d'acidifier le lait en 24 heures et de croître dans un milieu contenant le lactose comme seule source d'hydrate de carbone. On parle alors de variants lents (slow coagulating variants) ou de souches lactose négative (Lac⁻). L'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques est également un facteur influençant leur développement dans le lait et la production d'acide (Christensen et al., 1999).

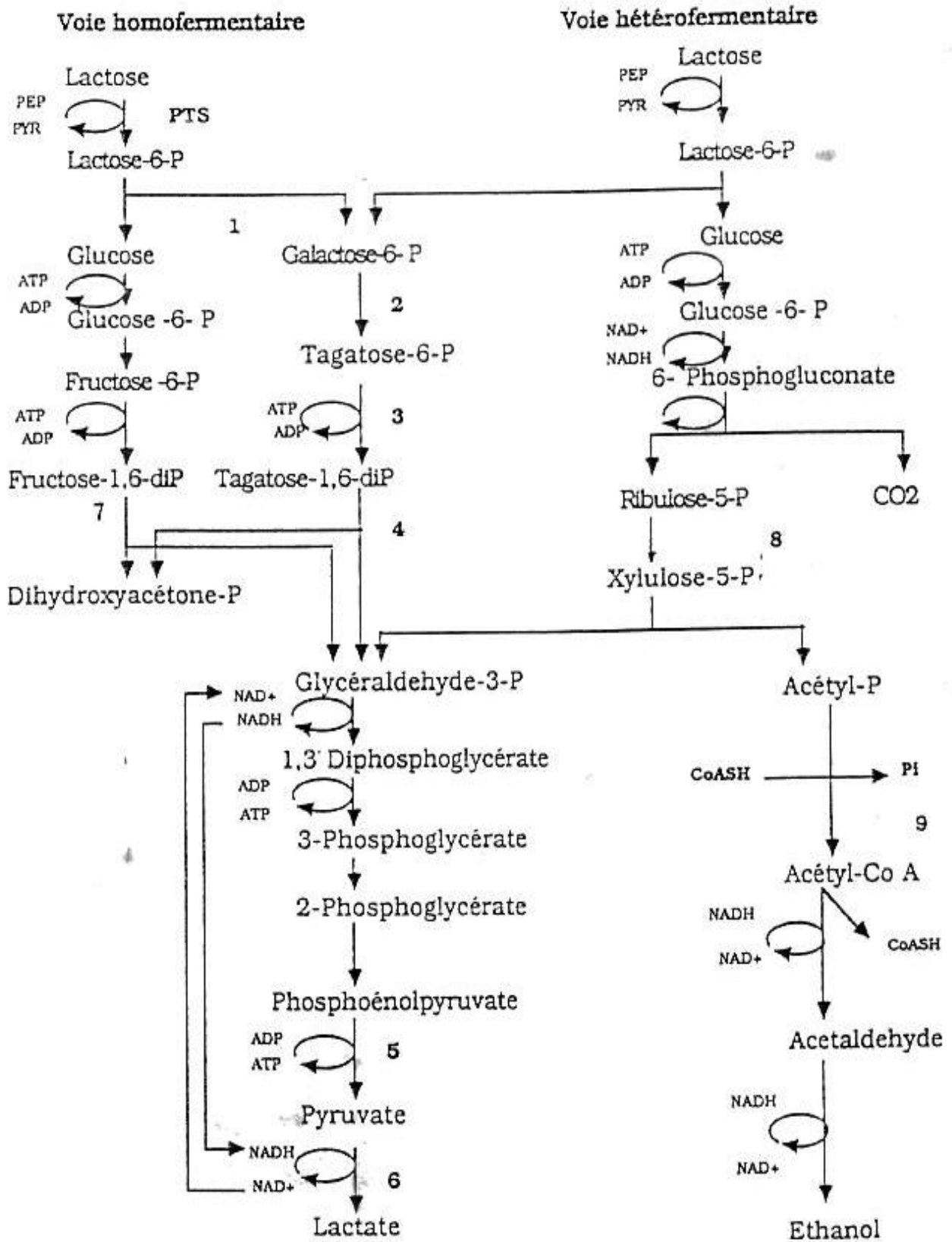


Figure 1 : Catabolisme du lactose chez les bactéries lactiques (Novel, 1993).

(1) : phospho- β -galactosidase ; (2) : tagatose-6-phosphate isomérase ; (3) : tagatose-6-phosphate kinase ; (4) : tagatose-1,6-diphosphate aldolase ; (5) : pyruvate kinase ; (6) : lactate déshydrogénase ; (7) : fructose-1,6-diphosphate aldolase ; (8) : pentose-5-phosphate cétolase ; (9) : éthanol déshydrogénase.

2.2/ Métabolisme du citrate

Le citrate est présent en faible concentration dans le lait (environ 1,7 mg/ml) comparativement au lactose (environ 49 mg/ml), mais il constitue néanmoins une substance clé dans l'élaboration des produits laitiers fermentés (Deroissart, 1994). Le citrate est en effet un des précurseurs du diacétyl, de l'acétaldéhyde, de l'acétate et du CO₂, qui sont les principaux responsables de l'arôme des produits laitiers frais (Devis et al., 1994).

Le citrate n'est pas utilisé par les bactéries lactiques comme source d'énergie, bien qu'il favorise leur croissance, et ne peut être métabolisé qu'en présence d'un sucre fermentescible et une source d'azote. Les principales bactéries qui utilisent le citrate sont : *Sc. diacetylactis*, les leuconostocs et les lactobacilles hétérofermentaires.

Le transport du citrate à travers la membrane bactérienne implique la présence d'une citrate perméase qui est inductible et n'est active qu'aux pH inférieurs à 6. Une fois, à l'intérieure de la cellule, la molécule de citrate est scindée en acétate et en oxaloacétate par la citrate lyase (citratase). L'oxaloacétate est ensuite converti en CO₂ et en pyruvate par une oxaloacétate décarboxylase. Ce dernier joue un rôle clé puisque les bactéries lactiques disposent de plusieurs possibilités pour l'utiliser dans sa fonction comme précurseur d'arôme. Cet acide est converti en molécules C₄, c'est à dire le diacétyl, l'acétoïne et 2, 3 butanédiol (2,3 butylène glycol) (Deroissart, 1994).

En cultures pures dans le lait, le comportement des *Sc. diacetylactis* et des leuconostocs sont très différent en ce qui concerne la production de diacétyl et d'acétoïne. *Sc. diacetylactis* consomme le citrate et produit du diacétyl et de l'acétoïne dès le début de la croissance. Le niveau de production atteint un maximum au moment où le citrate est épuisé, et les quantités produites dans le milieu sont au maximum : de 12 μ g/ml en diacétyl et de 500 μ g/ml en acétoïne. En suite la teneur en diacétyl décroît sous l'effet de la diacétyl- réductase.

Aussitôt le citrate épuisé, la teneur en diacétyl diminue, cela signifie que la synthèse de ce produit s'opère plus rapidement que sa réduction en acétoïne. C'est pour cette raison qu'il est conseillé de refroidir les produits laitiers frais lorsque le citrate est épuisé (fin de la phase exponentielle de croissance), de façon à maintenir le diacétyl à une teneur élevée. La figure 2 montre le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques.

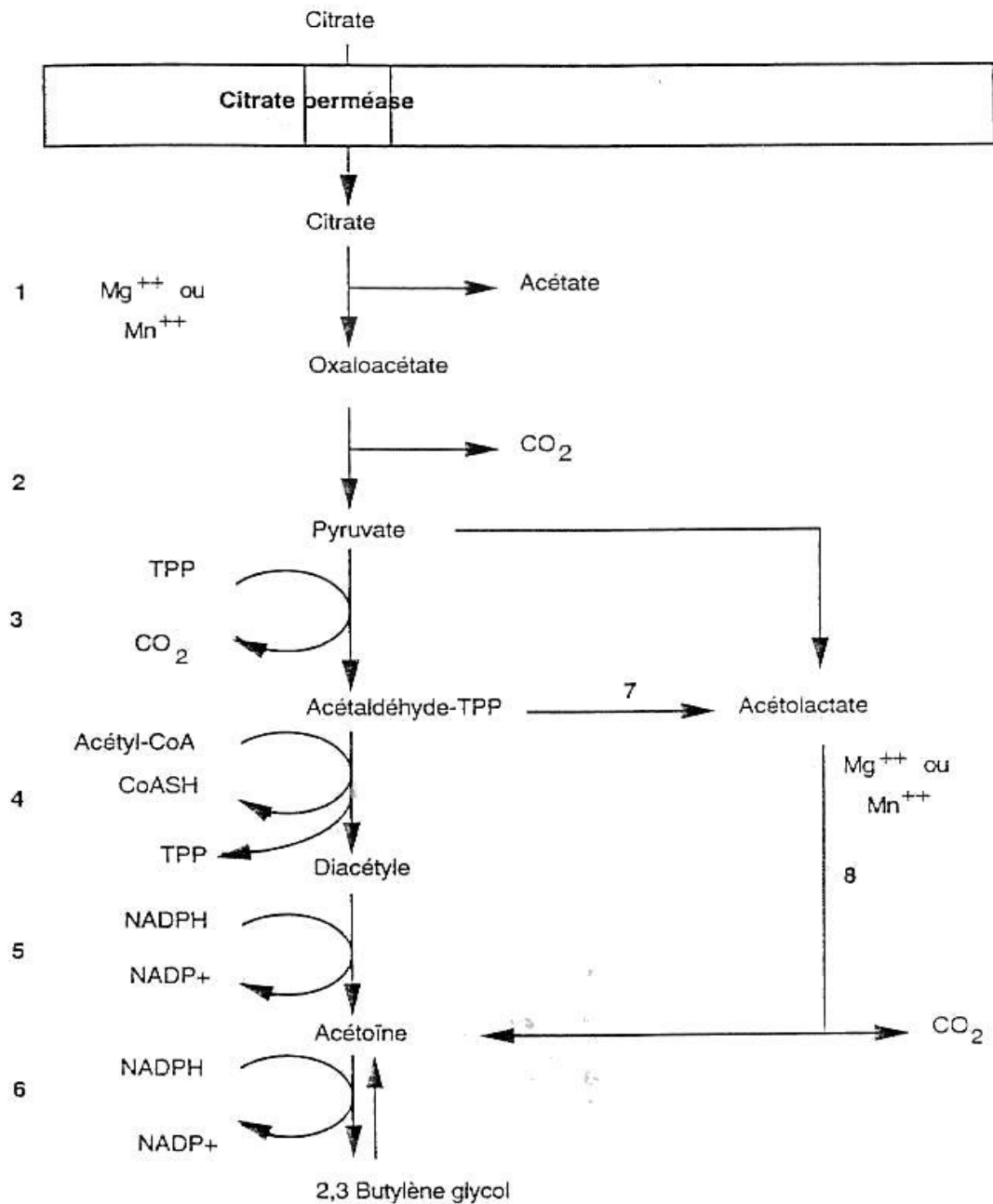


Figure 2 : Différentes voies de transformation anaérobie du citrate chez les bactéries lactiques (Cogan, 1981).

TPP : thiamine pyrophosphate ; (1) : citrate lyase (citratase) ; (2) : oxaloacétate décarboxylase ; (3) : pyruvate décarboxylase ; (4) : diacétyle synthétase ; (5) : diacétylréductase ; (6) : acétoïne réductase ; (7) : acétolactate synthétase ; (8) : acétolactate décarboxylase.

Selon Oberman et *al.* (1982), les souches de *Lc. diacetylactis* produisent un niveau maximal de diacétylène après 6 heures de culture. Le même auteur a démontré que lorsque la température d'incubation augmente de 23 °C à 28 °C, la production de diacétylène augmente d'environ 30 %.

Pour ce qui est de l'effet de l'oxygène sur la production du diacétylène et d'acétoïne, Bassit et *al.*, (1993) ont démontré que la production de diacétylène et d'acétoïne dans les cultures de lactocoques augmente quand la concentration initiale de l'oxygène augmente. Quant à l'activité de l'eau, en la régularisant par l'ajout du glycérol, ces mêmes auteurs ont remarqué que le taux de croissance de *Lc. diacetylactis* est linéaire à l'activité d'eau dans un milieu lactique et qu'en phase de croissance exponentielle, un taux élevé de l'activité d'eau ($a_w > 0,95$) est caractérisé par une consommation marquée de lactose et des acides aminés.

Le diacétylène a été identifié comme étant un des principaux composés d'arôme des laits et crèmes fermentées, la crème sure et le yogourt.

2.3/ Métabolisme des protéines

Les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés et doivent donc faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (Desmazeaud, 1994). Le fractionnement des protéines du lait en acides aminés se fait par des enzymes spéciales : les protéinases et les peptidases. Ces enzymes synthétisées par les bactéries lactiques peuvent être extracellulaires (fixées à la paroi ou à la membrane) et intracellulaires (Leveau et Bouix, 1993):

➤ Les protéinases :

Elles sont liées à la paroi des bactéries, au voisinage de la surface et peuvent ainsi dégrader les grosses molécules du milieu. La culture dans le lait est doublement favorable à l'activité des protéinases ; d'une part, par la présence d'ions Ca^{2+} et, d'autre part, par l'abaissement du pH. La faible teneur du lait frais en acides aminés libres n'entrave pas la synthèse des protéinases, tandis qu'une forte concentration la réprime jusqu'à épuisement des substances azotées assimilables.

Toutes les protéines du lait peuvent être dégradées par les protéinases des bactéries lactiques mais avec une vitesse et un taux d'hydrolyse différent (Ezzat et *al.*, 1985, 1987).

➤ *Les peptidases*

- Les péptidases liées à la paroi : leur spectre d'activité et leur localisation varient suivant l'espèce, *Lactococcus lactis* possède une di et tripéptidase qui lui confèrent une plus grande autonomie (par rapport à *Lactococcus cremoris* qui en est dépourvue) et explique sa dominance dans la microflore sauvage du lait.
- Les péptidases liées à la membrane : elles interviennent dans le transport des peptides à l'intérieur de la bactérie.

En présence de concentrations élevées de NaCl dans le lait, il y a un désaccouplage de la production d'acide et de la croissance qui serait du à l'inhibition des systèmes de transport des peptides et des acides aminés.

- Les peptidases intracellulaires à large spectre d'activité : les lactobacilles possèdent des peptidases à spectre plus large que les streptocoques.

L'importance des protéinases ou protéases a été soulignée pour les lactocoques dont les souches sont souvent constituées de deux populations protéolytiques distinctes dont l'une (variant prt+) et l'autre (variant prt -). Selon Desmazeaud, (1994) et Champagne et *al.* (1998), le variant prt- utilise les acides aminés libres et se développe assez bien dans le lait. Cependant, la croissance du variant prt- est fortement stimulé par les produits de protéolyse du variant prt + dont l'hydrolyse de la caséine. La figure 3 montre le mécanisme de la proteolyse du lait par les bactéries lactiques.

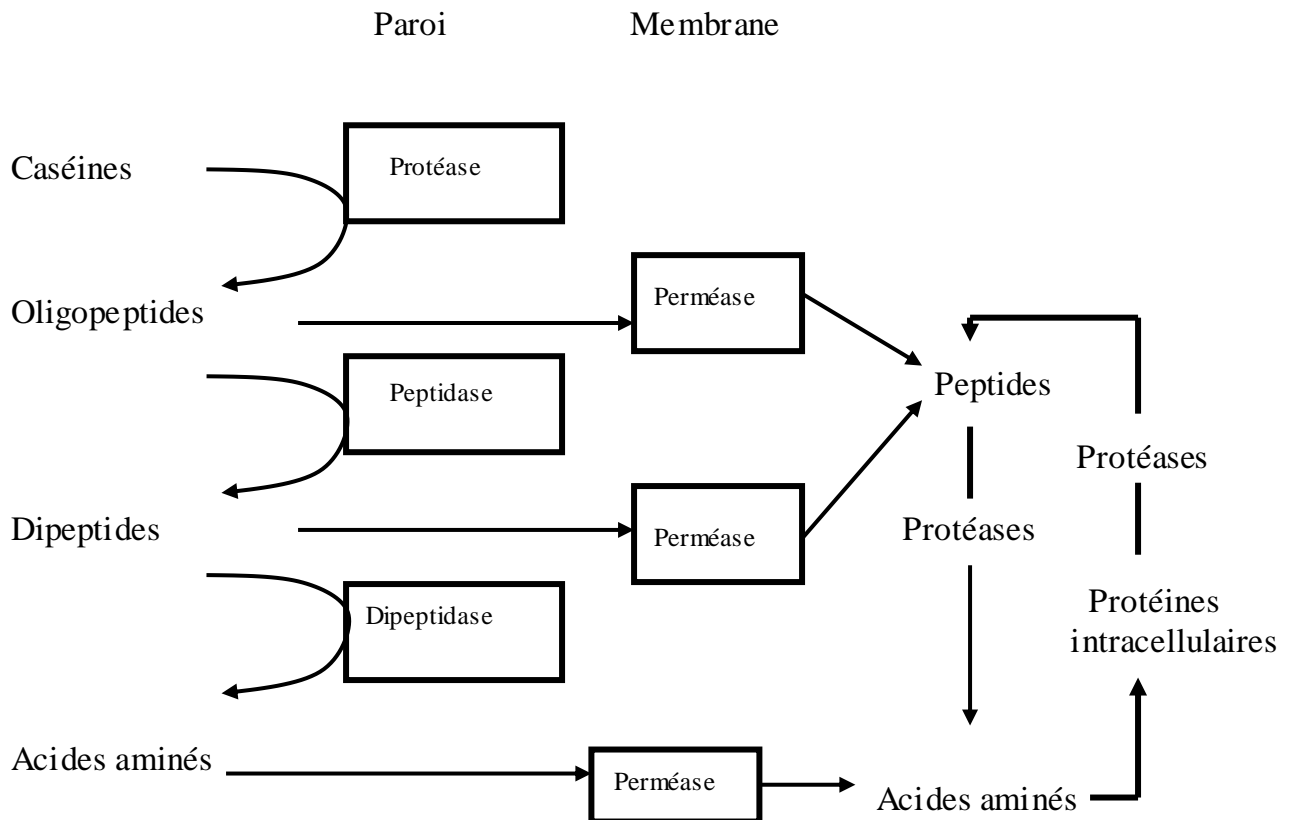


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la protéolyse du lait par les bactéries lactiques (Law, 1978).

2.4/ La lipolyse et l'estérolyse

L'activité lipolytique des lactocoques dans le lait serait faible mais pourrait contribuer à la flaveur des fromages affinés. Cependant, ces bactéries hydrolyseraient, grâce aux lipases, plus facilement les mono et les diglycérides que les triglycérides du lait (Desmazeaud, 1994).

Chez *Lactococcus lactis subsp. lactis* et son *biovar diacetylactis*, l'activité lipolytique et l'activité estérasique seraient à la fois cytoplasmiques et membranaires. Ces activités augmentent, mais faiblement en milieu lait et en phase exponentielle de croissance.

2.5/ Le métabolisme et les minéraux

La nécessité des minéraux métalliques dans le métabolisme chez les bactéries lactiques s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes.

Le magnésium serait important pour la survie de *lactococcus lactis*, il est souvent cité pour son rôle dans la paroi cellulaire en particulier pour l'activité des protéases de paroi (Leveau et Bouix, 1993).

Le potassium est nécessaire pour la régulation du pH intracellulaire.

Le cuivre augmente la production du diacétyle.

3/ Intérêts technologiques des lactocoques

Les lactocoques ou autres genres de bactéries lactiques produit comme ferments commerciaux sont des cultures pures ou des cultures en mélanges doivent remplir certaines qualités :

- ✓ Assurer des propriétés constantes et définies au produit transformé ;
- ✓ Permettre une bonne conservation de l'aliment en le préservant contre la détérioration par d'autres microorganismes. Enfin, de plus en plus, ces genres sont recherchés pour d'autres qualités nutritionnelles et thérapeutiques dans des préparations appelées probiotiques

Parmi les rôles utiles des lactocoques nous pouvons citer :

➤ **Production d'acide lactique**

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière. Dans les produits fermentés la baisse du pH dépend du pouvoir tampon du milieu, de la concentration en substrats fermentescibles et du pH limite toléré par les ferments.

La tolérance des micro-organismes vis à vis du pH est très variable. Face à un pH allant de 1 à 6,4 dans différents produits alimentaires, il existe d'autres facteurs physiques (température,...) ou chimique (concentration saline, A_w , ...) réduisant la tolérance des micro-organismes vis à vis de l'acidification. L'acidité maximale des lactocoques correspond à un pH de 4,5 (Antoine et *al.*, 1993).

➤ **Production d'arôme**

Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconservation optimale, d'un arôme et d'une texture caractéristique des produits alimentaires fermentés. Ainsi *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* est considérée comme principal fournisseur de diacétyle et d'acétaldéhyde à partir des citrates (Doleyres, 2003). Le tableau 14 donne les quantités de diacétyle et d'acétaldéhyde produites par les lactocoques.

Tableau 14 : Production de diacétyle et d'acétaldéhyde par les lactocoques.

Souches	Diacetyl ($\mu\text{g/ml}$)	Acétaldéhyde ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Lc.Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	0,60 –55,0	2,2 –11,3
<i>Lc.Lactis subsp.lactis</i>	0,05 –0,10	0,7 –2,3
<i>Lc.Lactis subsp.cremoris</i>	0,05 –2,3	0,3 –3,7

Source : Novel et Lequerler, (1995).

➤ **Production de polysaccharides**

Indépendamment de leur pouvoir acidifiant, les souches productrices d'agents épaississants confèrent aux produits laitiers des caractères rhéologiques particuliers portant notamment sur la viscosité (Girrafa et Bergere, 1987). En général, l'augmentation de la viscosité est attribuée à la production d'un polysaccharide qui, selon une étude portant sur plusieurs souches, serait essentiellement composé de galactose et de glucose ainsi que de petites quantités de xylose, arabinose, rhamnose et mannose.

Certaines souches de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* peuvent produire un exopolysaccharide dont le déterminant génétique est un plasmide instable. Cette propriété semble accroître la résistance des souches aux phages (Harteley et al., 1989).

➤ **Activité protéolytique**

La croissance des bactéries lactiques dans le lait et leur activité dans les fromages ont des conséquences bénéfiques : la fermentation du lactose en acide lactique acidifie le milieu et conjointement avec la protéolyse des caséines prépare la coagulation du lait et la synérèse du caillé nécessaire à l'affinage des fromages (Aubert, 1998).

➤ **Production de bactériocine**

Les potentialités inhibitrices des bactéries lactiques sont importantes. Les effets inhibiteurs dépendent de la nature du ferment inhibiteur, de la nature des souches de contaminants à inhiber, des proportions relatives des bactéries en présence et des conditions de culture. Le phénomène d'inhibition peut inclure un ou plusieurs mécanismes : compétition nutritionnelle, changement physico-chimique du milieu (pH, formation d'agents réducteurs) et formation d'agents antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, nisine).

Les progrès dans la connaissance des mécanismes d'inhibition, en particulier au niveau des conditions permettant leur manifestation, devraient permettre d'accroître leur utilisation en tant qu'agent de conservation des produits alimentaires.

Parmi ces bactériocines, chez les lactocoques, la nisine est la bactériocine la mieux décrite : peptide de 3500 D de masse moléculaire, insensible aux enzymes protéolytiques excepté à l' α -chymotrypsine, très instable en milieu basique. Son pH_i électrique est supérieur à 10,5. Sa structure en anneau lui confère une remarquable thermorésistance (Benech, 2002).

Accomplissant les critères d'un additif alimentaire, elle est employée comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire.

Chapitre 4 : CARACTERISATION DE LA ZONE D'ETUDE**1/ Présentation du périmètre du moyen Cheliff****1.1 / Situation géographique de la zone d'étude**

La région du Moyen-Chélif est située au nord-ouest de l'Algérie. Cette plaine occupe la partie centrale du bassin versant du Chélif et située à 200 Km d'Alger à une altitude de 150 m (figure 4).

La vallée du Chélif occupe la partie nord du bassin versant Chélif-ZAHREZ et est drainée par l'oued Chlef qui la traverse sur une longueur de 750 km pour déverser dans la méditerranée près de Mostaganem. La zone d'étude couvre la vallée du Cheliff, depuis 11 Km de l'amont d'Oum Drou, jusqu'à 10 km en aval de Boukadir. Elle s'étend dans la partie centrale jusqu'à Ouled Fares dans la vallée de l'affluent dit Oued Ouahrane. Ce secteur est limité :

- Au Nord par les monts de Medjadja (flanc sud du Dahra) d'altitude moyenne 600 m
- Au Sud par le massif de l'Ouarsenis d'altitude moyenne 1200 m.

Il s'étend sur les communes : Ouled Abbes, Oum Drou, L'abiodh Medjadja, Chlef, Chettia, Ouled Fares, Sobha, Oued fouda, Oued Sly et Boukadir.

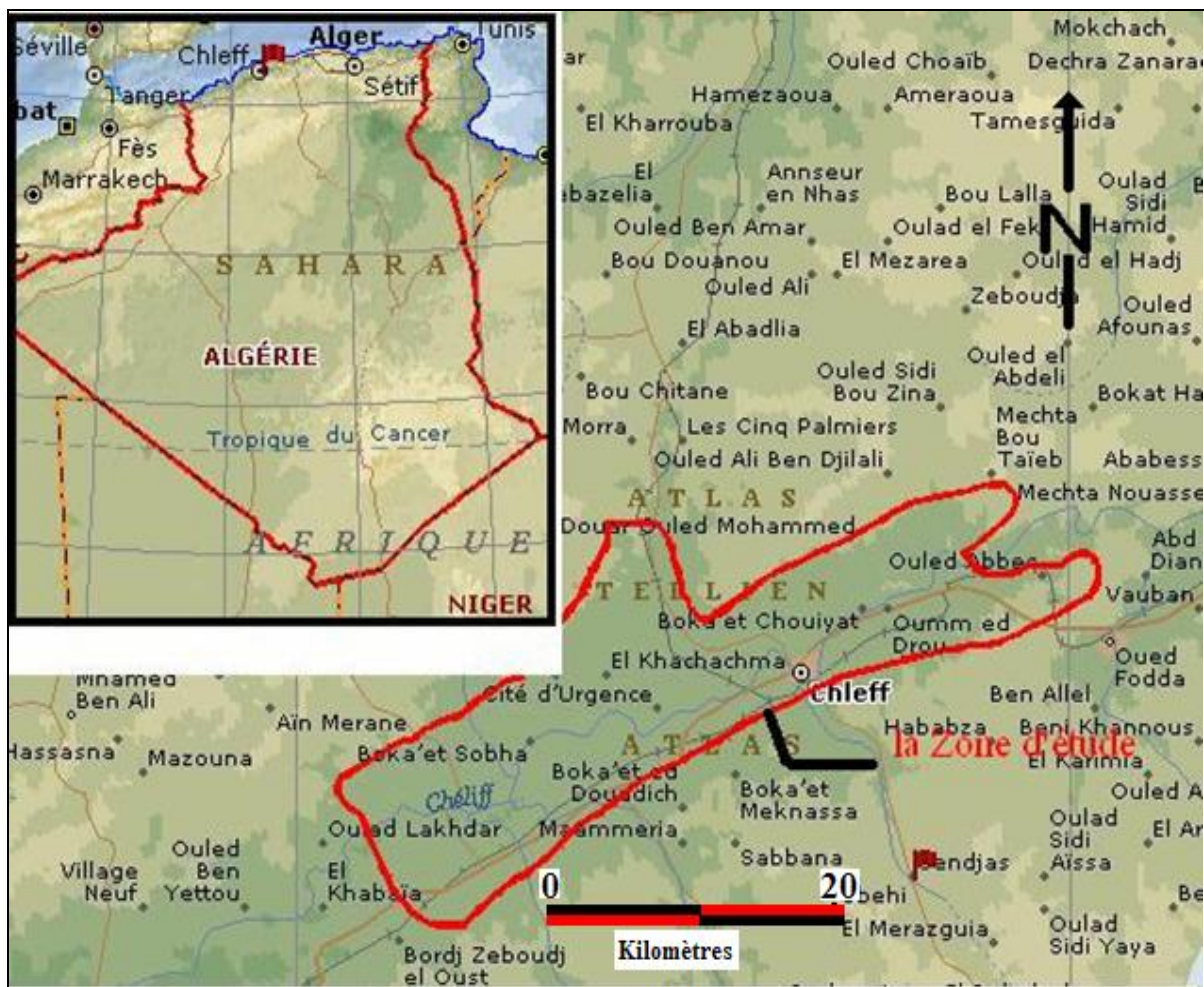


Figure 4 : Situation de la zone d'étude (source Atlas mondial, année 2005)

1. 2/ Aperçu morphologique

Le bassin du moyen Cheliff occidental qui correspond à un bassin sédimentaire d'orientation Est – Ouest comprend les ensembles morphologiques suivants :

- Les collines de Medjadja avec une altitude de 400 à 500 m ;
- Les montagnes rouges, et leur prolongement oriental avec une altitude de 160 à 200 m ;
- Les plateaux situés au Sud–Est et au Sud–Ouest de la ville de Chlef avec une altitude de 200 à 350 m ;
- La plaine du Cheliff qui forme une étroite bande dans sa partie orientale d'une dizaine de kilomètre de largeur qui draine le Cheliff.

2/ Le climat

Les plaines du Chélif, en général, ont un climat spécial, de type continental semi - aride, célèbre par sa dureté, malgré la proximité de la mer (50 km en moyenne) (Scet-Agri, 1985). Généralement, on assiste à un été long et tempéré, des hivers pluvieux et froids et des automnes et des printemps très courts. La plaine du Cheliff est reconnue en Algérie par sa chaleur en été, notablement élevée ; en effet, elle a été citée comme " Curiosité" météorologique.

La classification du climat de la région d'étude est basée sur les données des stations de L' ANRH et L'ONM de Chlef.

2.1/ Les précipitations :

Les précipitations dans le Moyen-Chélif sont très irrégulières dans le temps et dans l'espace. Le réseau de plusieurs stations pluviométriques implantées et gérées par l'ANRH assure les relevés de ce facteur

La station de Chlef appartenant à l'ONM servira de référence, compte tenu de la fiabilité de ses données. Les données se répartissent sur une échelle mensuelle de 1980 à 2004. Une étude statistique des données des précipitations montre que la précipitation moyenne varie entre 200 et 550 mm.an⁻¹. La saison hivernale est la plus pluvieuse avec une moyenne de 45 mm.mois⁻¹ et un pic au mois de novembre. Par contre, l'été est sec avec une faible recharge de 4 mm.mois⁻¹.

2. 2/ Température

Les relevés de températures pour la période allant de 1981/1982 à 2003/2004 relatives à la station de Mouafkia (nord de la ville de Chlef), appartenant à l'ONM – Chlef, donne une moyenne annuelle qui avoisine les +20°C, mais il existe un écart considérable (plus de +20°C) entre le mois le plus chaud qui est juillet (+39,2°C) et celle du mois le plus froid, janvier (+10,5°C).

Avec les données de la station de l'ONM et pour la même période, nous avons construit le diagramme ombrothermique (figure 5), qui montre qu'il y a une longue période de sécheresse s'étalant entre la dernière décade du mois d'avril à la mi-octobre.

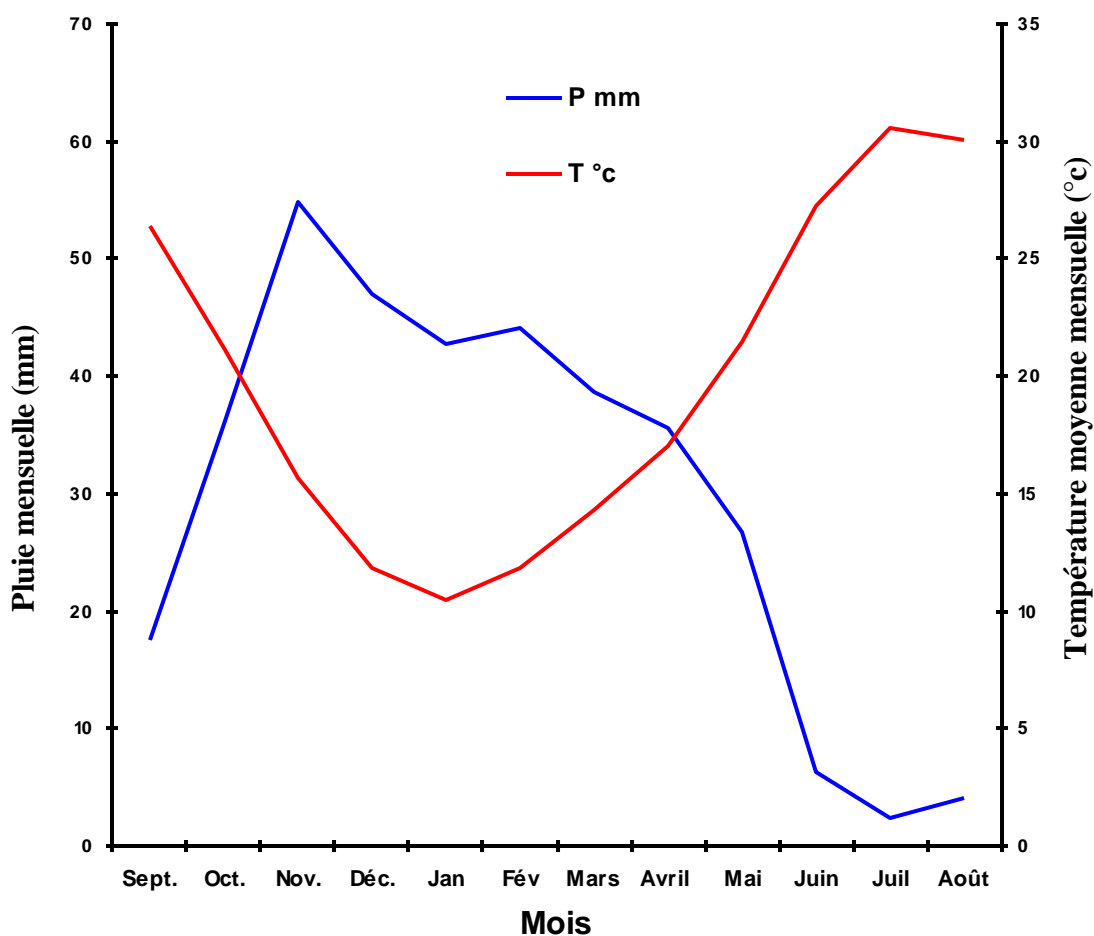


Figure 5 : Diagramme ombrothermique d'après les données de l'ONM de 1981/1982 à 2003/2004.

3/ Contexte socio – économique

3.1/ Population

Le bassin versant du moyen Cheliff est partagé entre trente (30) communes appartenant aux trois wilayas (Chlef 20 sur 35), Tissemsilt (8 sur 22) et Relizane (2 sur 38), mais la vallée étudiée est partagée entre neuf (09) communes sur trente cinq (35) de la wilaya de Chlef (Figure 6): Chlef, Oued Sly, Boukadir, Sobha, Chettia, Ouled Fares, l'Abiodh Medjadja, Oum Drou et Ouled Abbas.

La population est évaluée pour les neuf communes à 469723 habitants en 2004 (DPAT). Cependant, la distribution de cette population ne se fait pas d'une manière rationnelle, elle est concentrée dans les villes comme Chettia, Chlef, Oued Sly, Boukadir, tandis que les zones rurales sont quasi-exodes.

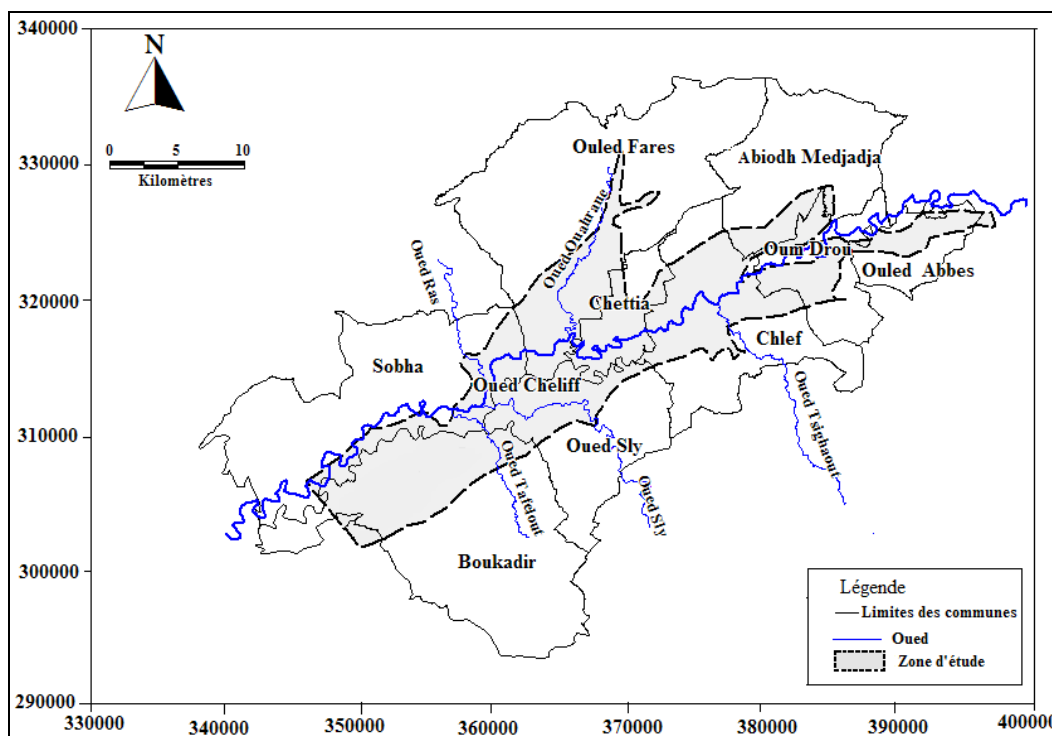


Figure 6: Situation des communes de la vallée du moyen Cheliff

3.2/ Agriculture et élevage

Selon le rapport de schéma d'aménagement régional de l'ANAT, l'industrie est faible dans le Moyen-Chélif ; la répartition des occupations des tranches d'activités montre l'importance de l'activité agricole :

- Agriculture 45,40 %
- Industrie 8,18 %

L'agriculture est caractérisée en particulier par la dominance de l'arboriculture fruitière notamment les agrumes, concentrée sur la rive droite de l'oued Cheliff. Le maraîchage vient en seconde position et se pratique dans les parties Nord et Ouest (Sobha, Chettia, Ouled Fares, l'Abiodh Medjadja et Boukadir). Quant aux céréales et fourrages, leur production est limitée dans la partie Est surtout, dans les communes l'Abiodh Medjadja, Oum Drou et Ouled Abbas (figure 7).

La superficie actuelle cultivée est de 9041 ha dont 1000 ha conduite en sec, 400 ha en jachère et 7641 en ha irriguée. Les services de L'OPIC assurent l'irrigation qui représente 42 % de la surface totale irriguée (soit 3 205,06 ha) en utilisant les eaux de surface uniquement, tandis que 58 % de cette surface sont assurés par les agriculteurs (soit 4035,94 ha) en utilisant les eaux souterraines.

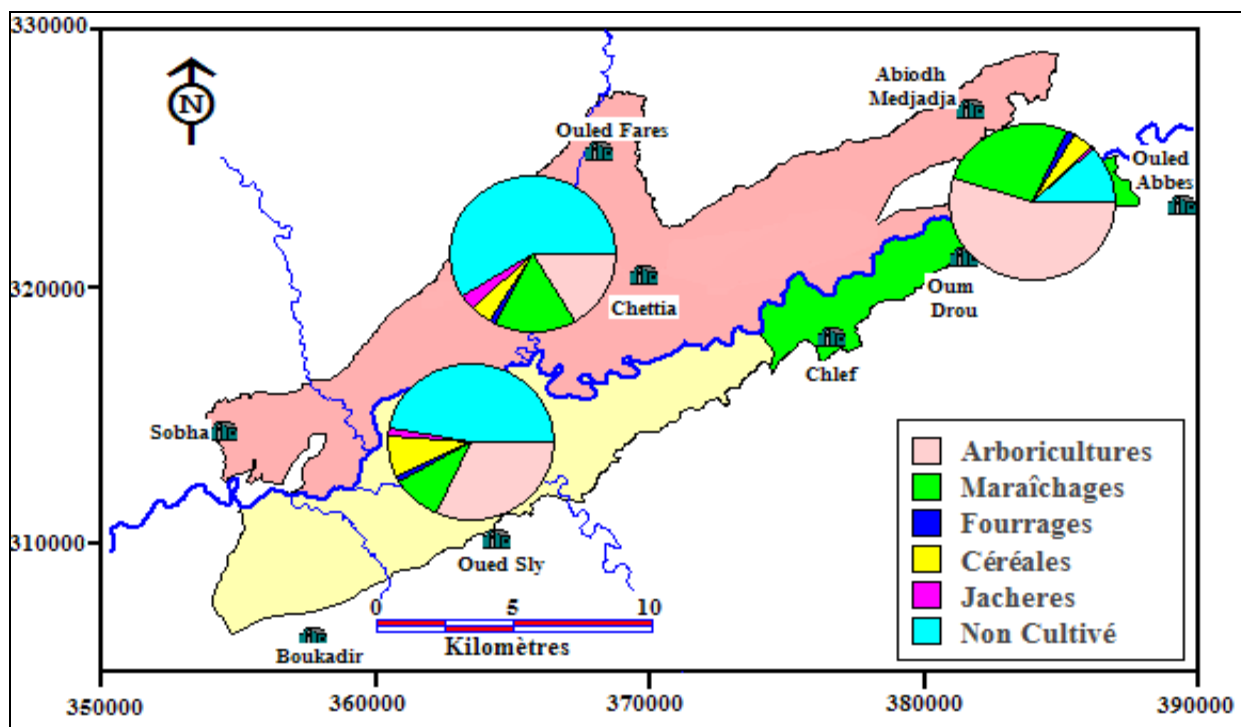


Figure 7 : Répartition des cultures dans les zones du périmètre du moyen cheliff pour l'année 2004

L'élevage dans la zone d'étude est une pratique réservée généralement aux privés. Les avicultures dominant (figure 8).

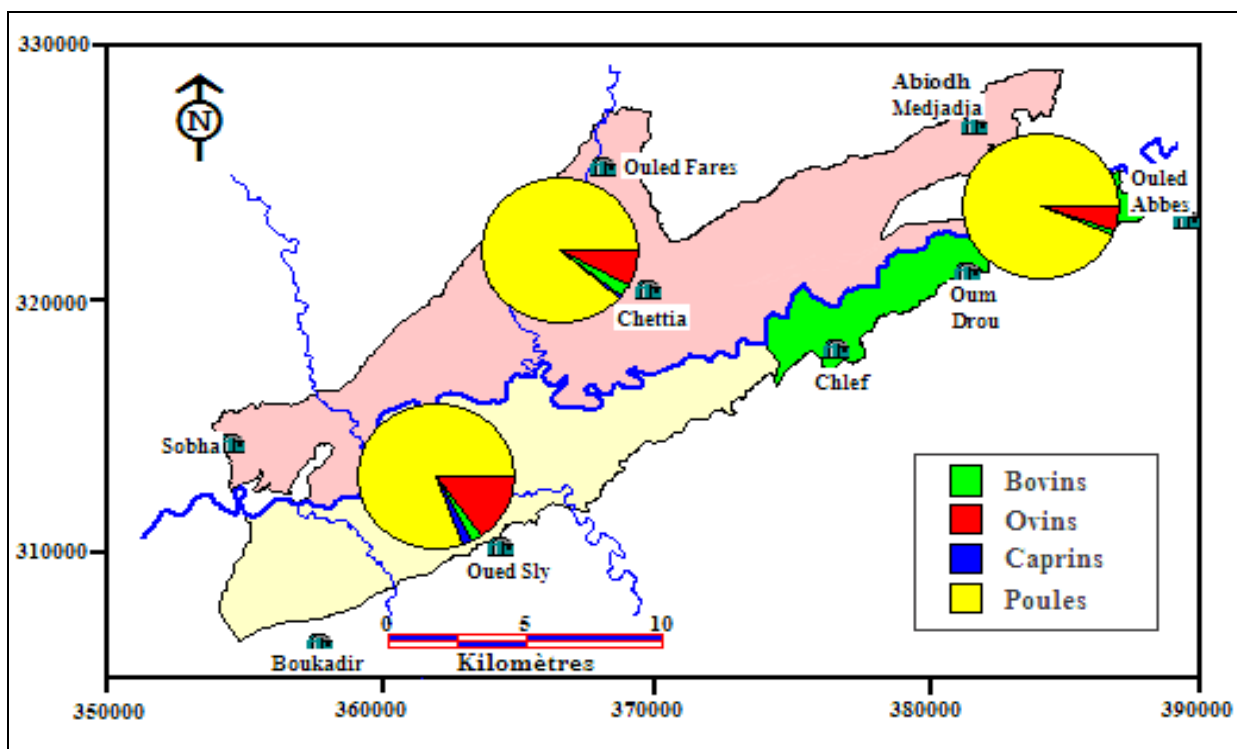


Figure 8 : Répartition de l'élevage dans le périmètre du moyen Cheliff (année 2004)

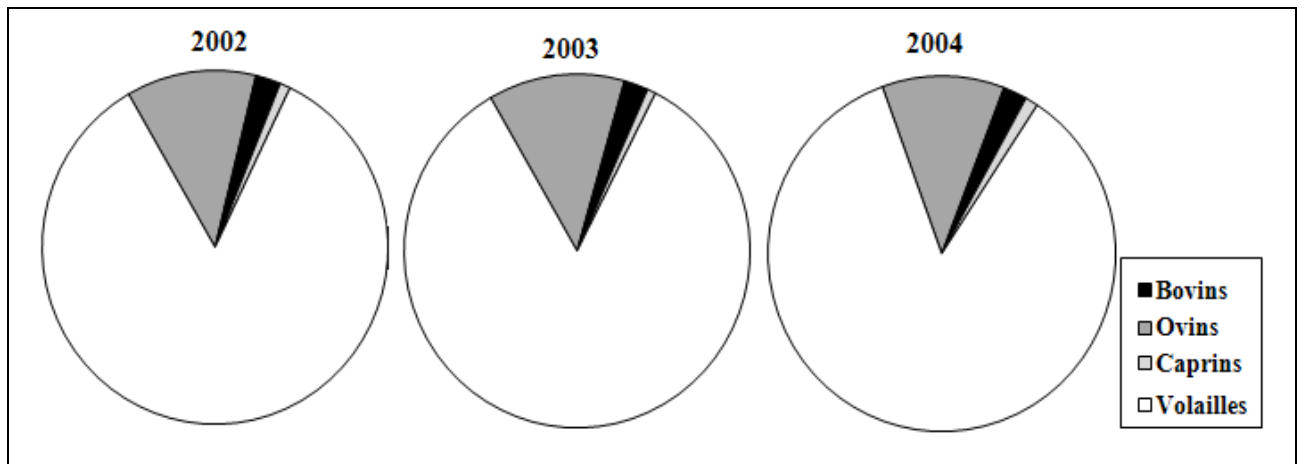


Figure 9: L'évolution de l'élevage dans la vallée du moyen Cheliff pour les années 2002, 2003 et 2004

Chapitre 1 : MATERIELS ET METHODES

I/ Matériel

1/ Matériel biologique

1.1/ Le lait :

1.1.1/ Techniques de prélèvement du lait

Les échantillons de laits ont été aseptiquement prélevés. Le pis et la mamelle ont été nettoyées à l'eau savonneuse, rincées à l'eau stérile et essuyées à l'aide d'une serviette de papier stérile. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. La fréquence et les lieux de prélèvement sont indiqués dans le tableau 15.

Le lait a été recueilli dans un flacon en verre de 250 ml stérile après avoir éliminer la première dizaine de jets, conservé à 4 °C et acheminé directement au laboratoire pour analyse. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin.

Les échantillons ont été soigneusement étiquetés (espèce, race, lieu, date de prélèvement, état physiologique de l'animal, période de traite,...).

1.1.2/ Estimation de la charge microbienne des laits prélevés

Afin de déterminer la qualité des sources de prélèvement et de se faire une idée sur le degré de contamination des laits prélevés on a eu recours à l'épreuve au bleu de méthylène. Cette estimation peut être mise en évidence en additionnant le lait du bleu de méthylène qui donne par réduction un leuco-dérivé incolore.

Une décoloration avant 15 mn indique un lait fortement contaminé. Si la décoloration a lieu en moins d'une heure le lait est peu contaminé. Entre 1 h et 3 h, le lait est légèrement contaminé. Au dessus de 3 h, le lait est considéré comme étant de qualité satisfaisante.

1.2/ Souches de lactocoques

Les souches présumées lactocoques ont été isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chellif en différentes saisons de l'année (hiver, printemps et été) de l'année 2006. Elles ont été cultivées sur milieux sélectifs et conservées en vu d'être étudiées. Des souches industrielles fournies par l'ORLAC des ARRIBS (Arib, W-Ain Defla) sont utilisées comme souches de référence.

Tableau 15: Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.

Région	Lieu	Origine animale	Nombre de prélèvement
Périmètre du moyen Chélif	Oued Fodda	Vache + Brebis	3 + 1
	El-Karimia	Vache + Brebis	2 + 1
	Bir Saf-Saf	Vache + Brebis	2 + 2
	Oum Drou	Vache	3
	Ouled Abbes	Vache + Brebis + Chèvre	2 + 1 + 1
	Chlef centre	Vache	3
	Chettia	Vache + Chèvre	2 + 2
	Ouled fares	Vache + Chèvre + Brebis	2 + 1 + 1
	Boukadir	Vache + Chèvre + Brebis	1 + 1 + 2
	Oud -Sly	Vache	4
	Medjadja	Vache + Chèvre + Brebis	2 + 2 + 1

II/ Méthodes

1/ Techniques d'isolement et de purification

1.1/ Techniques d'isolement

L'isolement a été effectué à partir des échantillons considérés comme sains (non contaminés) le jour même de leur réception.

Une série de dilutions décimales dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-5} est réalisée à partir de l'échantillon que l'on aura homogénéisé par au moins 10 secondes d'agitation. Les 03 dernières dilutions ont étéensemencées en masse dans les boites de pétri contenant le milieu M17 (Terzaghi, 1975) (figure 10).

Les boites sont incubées couvercles en bas à 30 °C pendant 24 h (figure 10).

1.2/ Techniques de purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon M17 jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries.

La pureté des souches est confirmée par prélèvement de colonies représentatives du genre lactocoques, après chaque repiquage, par observation microscopique après qu'on ait effectué pour chaque échantillon analysé la coloration de Gram et le test de la catalase.

Il n'y a que les bactéries Gram positif et catalase négative qui sont retenues et conservées pour une identification ultérieure.

1.3/ Conservation des souches

- *Conservation à 4 °C* : si les cultures des échantillons analysés paraîtront pures sur boîtes de pétri, des colonies sont reprise puisensemencées sur bouillon M17 et conservées à 4 °C pour identification.

Cette méthode est utilisée pour la conservation des souches durant une courte durée.

- *Conservation à - 20 °C* : elle est utilisée pour la conservation des souches pour une longue durée. Elle s'effectue en conservant des cultures jeunes à - 20°C,ensemencées massivement (5%) sur milieu LTSG dont le glycérol (25%) joue le rôle de cryoprotecteur.

1.4/ Techniques d'identification des souches isolées

L'identification des souches purifiées est réalisée selon une procédure à plusieurs étapes successives comme le montre la figure 11.

1.4.1 Etude des caractères cultureux

La culture des souches purifiées sur gélose M17 permet d'obtenir des colonies séparées nous permettrons de décrire la taille, la couleur, l'aspect (brillant, mat, muqueux), la consistance, le contour et la forme de ces colonies. Cet examen peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire.

1.4.2/ Etude des caractères morphologique des cellules

La coloration de Gram est effectuée sur frottis. Les bactéries à Gram positif sont de coloration violette et celles à Gram négatif sont de coloration rose.

L'observation microscopique des cultures permet de mettre en évidence la morphologie, la taille et l'arrangement des cellules.

Des caractères structuraux peuvent éventuellement être mis en évidence par le biais de la coloration de Gram qui permet une distinction des bactéries en deux grands groupes, en fonction des colorations finales des cellules. Les différences de coloration proviennent de différences structurales de la paroi bactérienne.

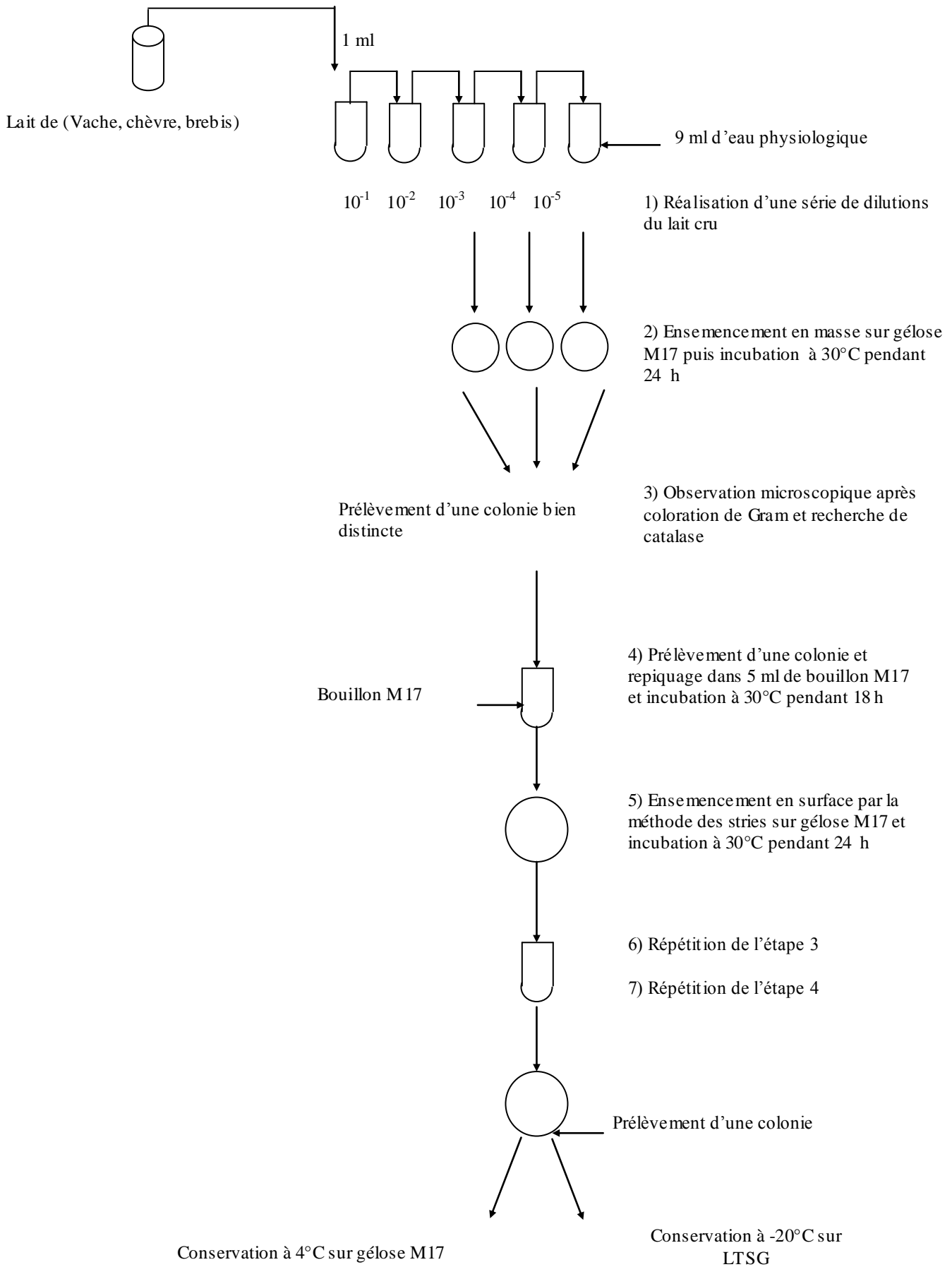


Figure 10 : Diagramme d'isolement et de purification des lactocoques

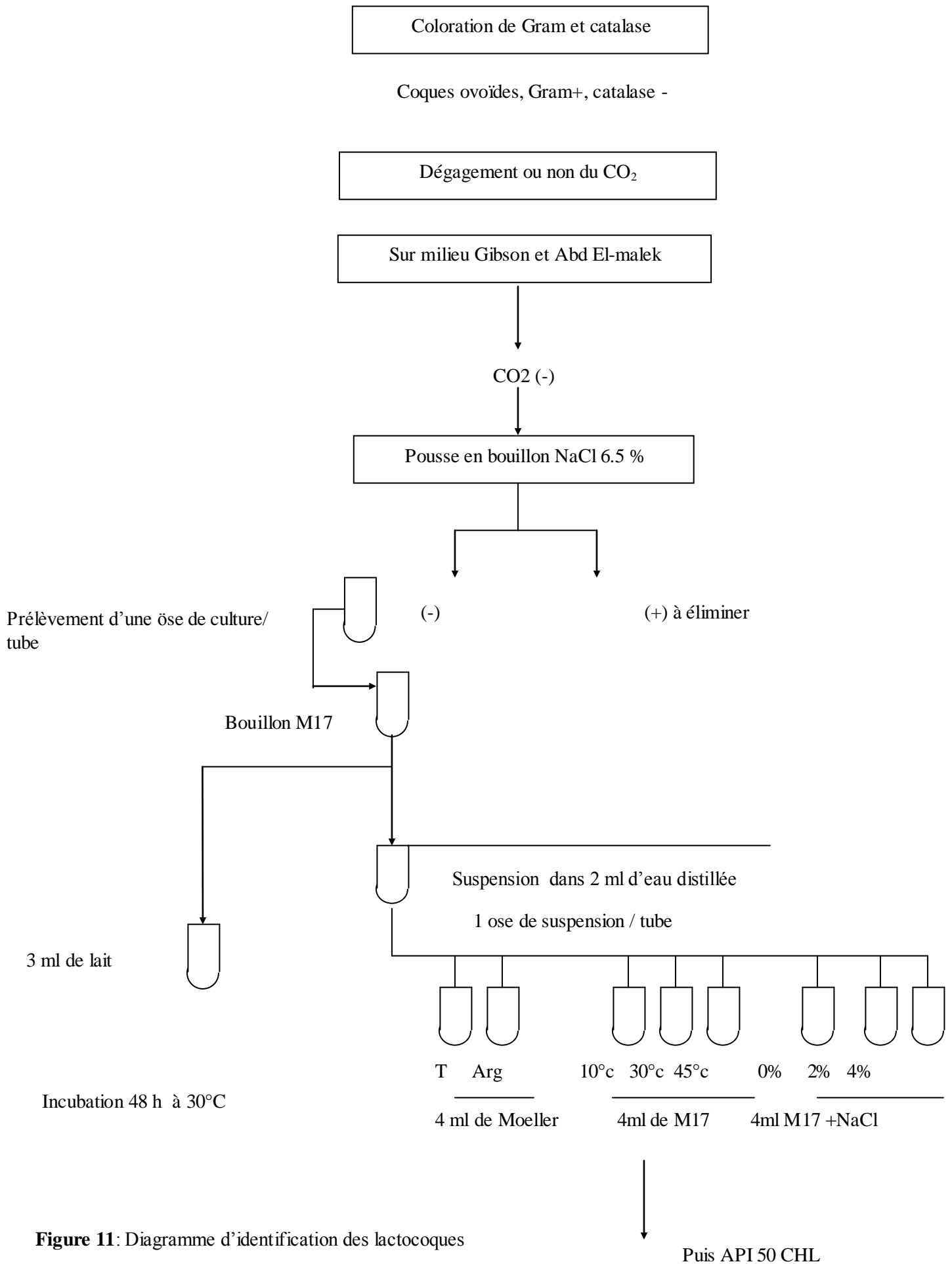


Figure 11: Diagramme d'identification des lactocoques

1.4.3/ Etude des caractères physiologiques

➤ *Type respiratoire*

On utilise pour ce test la gélose profonde de type VF (viande-foie) réparti en tubes en culot de 10 à 15 cm. Le milieu estensemencé à l'aide d'une pipette pasteur (avec la valeur de 3 à 4 gouttes des cultures de souches jeunes) que l'on plonge au fond du tube puis que l'on remonte en décrivant une spirale de façon àensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur, après refroidissement et solidification, le milieu est mis à incuber 24 heures à 30°C.

Cette technique permet de classer les micro-organismes en 4 catégories principales selon le résultat : aérobie, anaérobie, aéro-anaérobie et microaérophiles.

Dans le cas des lactocoques se sont des germes microaérophiles comme toutes les bactéries lactiques.

➤ *Température de croissance*

L'aptitude à la culture est testée à 10 °C et à 45 °C en ensemençant des tubes de bouillon M17 .. Les tubes à 45 °C sont examinés au bout d'un délai de 24 heures et ceux à 10 °C après 7 jours. Il est parfois utile de tester la croissance à des températures de 50 °C ou plus afin de différencier entre lactocoques et Streptocoques thermophiles.

➤ *Test de croissance en milieux hostiles*

- **Halophilie** : Pour étudier l'halophilie des lactocoques, on cultive des souches pures sur milieu hypertonique (bouillon M17) en présence de concentrations variables de NaCl allant de 2, 4 et 6,5 %.

L'incubation est réalisée durant une période de 24 heures à 30 °C.

La croissance est appréciée par l'apparition de troubles.

- **Croissance à pH 9,6** : Ce test est réalisé en inoculant un milieu liquide (bouillon M17), dont le pH est porté à 9,6 par le biais de NaOH 0,1 N, par des souches pures.

Les tubes sont incubés à 30 °C pendant 24 heures.

- **Croissance sur milieu bilié** : La tolérance des lactocoques à la bile a été étudiée par ensemencement d'une série de tubes du milieu M17 par une suspension fraîche de souches isolées additionnés de 0,3 % de bile. Après 24 heures d'incubation à 30 °C, la croissance de ces souches est appréciée par la détermination de la densité optique à 620 nm (Tanaka et *al.*, 1999).

➤ **Test de thermorésistance**

Le chauffage est réalisé à l'aide de tubes de bouillon M17 inoculés par des souches pures que l'on chauffe à 60 °C pendant 30 minutes.

Il faut prendre garde de ne pas souiller les bords du tube en inoculant et de refroidir rapidement les tubes après chauffage.

L'incubation est réalisée durant une période de 24 heures à 30 °C. la présence de trouble indique une thermorésistance.

Contrairement aux souches thermophiles, les souches mésophiles sont incapables de se développer.

➤ **Croissance sur lait bleu de Sherman**

Le bleu de méthylène est décoloré par les germes possédant une activité réductasique : cette propriété est utilisée pour estimer la charge microbienne du lait, mais également pour caractériser des espèces. Du lait à 1 % de bleu de méthylène estensemencé et incubé pendant 24 heures à 30 °C.

Dans ce milieu, les streptocoques fécaux et streptocoques lactiques mésophiles se développent, *Streptococcus thermophilus* ne se développe pas.

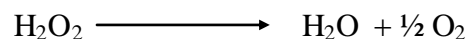
➤ **Tolérance au tellurite**

La tolérance au tellurite est recherchée par ensemencement de la gélose M17 contenant 0,4 % de tellurite de potassium. Les streptocoques résistants donnent des colonies noires ; ceux qui poussent mal donnent de petites colonies grises après incubation de 24 heures à 30 °C.

1.4.4/ Etude des caractères biochimiques

➤ **Mise en évidence de la catalase**

Cette enzyme respiratoire permet la décomposition de l'eau oxygénée produite enfin de chaînes d'oxydoréduction selon la réaction suivante :



Le test consiste à déposer une goutte d'H₂O₂, dilué au dixième, sur une lame de verre et à y ajouter, à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie jeune développée sur gélose M17. Le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux (O₂). Si la catalase est présente (Cat⁺).

➤ **Mise en évidence de l'oxydase**

Les oxydases sont mises en évidence par leur propriété de catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique par l'oxygène de l'air.

Le test peut être réalisé par la technique de Kovacs. Un disque « OX » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau puis un fragment d'une colonie de la culture est déposée à la surface. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

➤ **Culture sur lait tournesolé**

Le tournesol est un indicateur de potentiel d'oxydoréduction et de pH.

Ce test a pour objectif de mettre en évidence la présence de la réductase. Il se fait sur lait écrémé tournesolé. Un ensemencement à 1 % est réalisé à partir de la culture sur bouillon. L'activité au cours de la culture à 30 °C est notée : un virage du mauve au rose indique une acidification (A) due à l'attaque du lactose, une décoloration de l'indicateur depuis le fond du tube traduit une réduction (R), la souche peut ensuite coaguler le lait (C).

Les lactocoques réduisent le tournesol avant de coaguler le lait. *Streptococcus thermophilus* acidifie et coagule le lait sans réduction antérieure.

➤ **Recherche de la citratase**

Elle est mise en évidence par culture sur gélose semi-solide au lait citraté. La gélose est ensemencée dans la masse et incubée à 30 °C pendant 2 jours. La fermentation se traduit par la production de gaz.

Cette enzyme n'est présente que chez *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis*. Elle conduit à la formation d'acétoïne.

➤ **Hydrolyse de l'amidon**

Elle est testée par une culture sur gélose M17 additionnée de 0,3 % d'amidon soluble en boîtes de pétri. Après incubation de 24 heures à 30 °C, l'hydrolyse est caractérisée au lugol.

➤ **Etude du métabolisme carboné**

- **Recherche du type fermentaire** : ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est catabolisé. Il est homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : acide acétique, éthanol, CO₂,...

Ce test est défini de façon simple par le test de Gibson et Abd El Malek qui traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaires. On peut aussi utiliser le milieu de Mac Cleskey.

Les tubes sont incubés à 30 °C pendant 24 heures.

- **Etude de la fermentation des sucres** : l'étude du profil fermentaire des souches est effectué par ensemencement de tubes de milieu de base pour fermentation des streptocoques (eau peptonée à 0,5 % contenant du pourpre de bromocrésol BCP comme indicateur de pH) dans lequel on ajoute du sucre à la concentration finale de 0,5 %.

Les sucres étudiés dans ce milieu sont : le maltose, le tréhalose, le mélibiose, le raffinose, l'inuline, le sorbitol, l'arabinose, le mannitol, le lactose, le xylose, l'inositol, cellubiose, le rhamnose, le ribose et le galactose.

L'utilisation du lactose ainsi que la production ou non de H₂S peut être aussi mise en évidence par l'utilisation du milieu TSI.

Après 24 heures d'incubation à 30 °C, le développement de la culture se traduit par le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu par la fermentation du sucre.

Il est recommandé de faire un témoin sans sucre qui ne doit pas présenter le virage de l'indicateur.

➤ **Etude du métabolisme azoté**

L'activité de l'arginine dihydrolase (ADH) est étudiée par la méthode classique sur le milieu de Moeller.

Chaque tube est ensemencé par 3 ou 4 gouttes d'une suspension dense de culture diluée dans l'eau physiologique stérile. Après incubation, l'activité enzymatique se traduit par le virage vers l'alcalinisation de l'indicateur.

1.4.5/ Caractérisation technologique des souches

➤ **Caractère pathogène des lactocoques**

- **Production d'amines biogènes** : la décarboxylation de l'histidine est étudiée selon la méthode décrite par Joosten (1989). Elle consiste à comparer le pH de 02 échantillons : l'un contenant la souche à tester, incubé à 30 °C en présence de L-Histidine, l'autre ne contenant que la souche préparée dans les mêmes conditions. Si le pH de la première est supérieur à celui de l'autre, on peut penser qu'il y a décarboxylation de l'histidine, l'histamine étant plus basique.

- **Caractère hémolytique** : le caractère hémolytique est étudié par culture sur gélose au sang. Une base gélosée est fondue, ramenée à 45 °C, additionnée de 5 % de sang défibriné de cheval et coulée

en boîtes de pétri. Le milieu est ensemencé par les souches isolées par stries, après incubation et culture, l'aspect de la gélose autour des colonies est examiné :

- zone verdâtre : hémolyse α
- auréole claire : hémolyse β
- pas de modification : pas d'hémolyse ou γ

- **Activité protéolytique**

- **Hydrolyse de la gélatine** : un milieu à la gélatine est préparé (gélatine nutritive), réparti en culot et ensemencé dans la masse. Après refroidissement, les tubes sont incubés à l'étuve. Ensuite mis au réfrigérateur ; la persistance d'une liquéfaction à 4 °C traduit la protéolyse.
- **Hydrolyse de la caséine** : ce recherche à partir de milieux à base de lait : lait tournesolé. On peut observer après ensemencement et incubation à 30 °C une :
 - acidification du milieu avec souvent coagulation (lactose+) ;
 - alcalinisation simple (attaque de la caséine) ;
 - alcalinisation et peptonisation (éclaircissement progressif du milieu débutant vers la surface) ;
 - réduction du colorant au fond du tube.

➤ **Etude du pouvoir acidifiant** :

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique. Il s'agit d'ajouter au lait le volume nécessaire d'une solution alcaline (soude 0,1N) pour atteindre le point de virage d'un indicateur coloré (Phénolphthaleine à 1 % qui passe de l'incolore au rose). Le pouvoir acidifiant des souches est suivi dans des intervalles de temps de 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 et 96 heures. La courbe d'acidification en fonction du temps peut alors être tracée (Bradly et al., 1992).

L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°D), dans ces conditions 1 °D correspond à 0,1 ml de soude de 0,1 N. 1 °D = 0,1 g d'acide lactique/ L de lait.

➤ **Evolution de la biomasse**

L'évolution de la biomasse en fonction du temps a été déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm. En parallèle, pour estimer le développement des bactéries au cours de l'incubation des cultures pures, nous avons employé la méthode de dénombrement sur gélose M17.

➤ **Dosage des substances aromatiques : dosage du diacétyle**

1 ml de culture est prélevé dans un tube à essai à qui on ajoute 1 ml de solution de CARREZ 1, 1 ml de CARREZ 2 et 2 ml d'eau distillée ; le mélange subit ensuite une filtration. On ajoute à 0,4 ml de filtrat obtenu, une solution d' α - naphтол à 0,5 % et 4,6 ml d'eau distillée. Après agitation au mix-tube, on laisse le mélange réactionnel pendant 20 minutes à 30 minutes. L'absorption de la coloration développée est mesurée dans un spectrophotomètre à 420 nm. La concentration en diacétyle est déterminée par comparaison avec une courbe étalon en utilisant le diacétyle pure dans l'intervalle de 0 à 3 ppm de concentration (King, 1948).

➤ **Etude de l'antibiogramme**

Pour étudier le comportement des souches locales isolées de *Lactococcus lactis* vis à vis de certains antibiotiques les plus prescrits dans les soins vétérinaires, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide.

Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester, sont déposés sur la surface de la gélose M17ensemencée des souches isolées dont on veut étudier la sensibilité. L'antibiotique contenu dans le disque diffuse dans le milieu et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Il s'agit donc de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque après 24 heures d'incubation.

Les antibiotiques étudiés sont : la pénicilline, oxacilline, ampicilline et l'érythromycine.

2/ Traitement des résultats

Une nouvelle approche pour la caractérisation des souches est basée sur la vitesse d'acidification. Le pouvoir acidifiant de ces souches est étudié en utilisant quelques paramètres dérivés des courbes d'acidification.

Les données sont traitées par une méthode appelée l'analyse en composantes principales A.C.P. Le logiciel SPAD utilisé pour le traitement statistique des données, permettra de mettre en évidence une grande diversité et une répartition de souches en groupes et la comparaison entre elles.

2.1/ Principe de l'ACP

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode statistique essentiellement descriptive ; son objectif est de présenter, sous une forme graphique, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données (Diday et *al.*, 1982 ; Philipeau, 1992).

Ce tableau doit être constitué, en ligne par des individus (n) et en colonne par des variables quantitatives (p) sur lesquels sont mesurées des variables quantitatives (Gaudin, 1981 ; Dervin, 1992).

L'ACP permet de savoir comment se :

- ✓ structurent les variables et quelles sont celles qui sont associées quelles sont celles qui vont dans le même sens quelles sont celles qui s'opposent
- ✓ répartissent les individus ; quels sont ceux qui se ressemblent et quels sont ceux qui sont dissemblables.

Ce tableau définit alors deux espaces :

- l'espace des individus ou chacun d'eux (i) est représenté par un point de coordonnées

$(A_{i1}, A_{i2}, \dots, A_{ip})$.

- l'espace des variables ou chacune d'elles (j) est représentée par le point de coordonnées

$(A_{1j}, A_{2j}, \dots, A_{nj})$.

- de visualiser les observations dans un espace à deux ou trois dimensions.

Pour faciliter la visualisation des individus, l'ACP réduit les dimensions de cet espace à une dimension (axe principal) ou à deux dimensions (plan à deux axes). Les axes issus de cette réduction ne sont pas réalisés avec les variables initiales mais avec des indices synthétiques obtenus par combinaison linéaire des variables initiales. Ces axes sont appelés composantes principales ou axes principaux. Les individus sont alors représentés dans un espace à p dimensions.

Parmi tous les indices possibles, L'ACP recherche d'abord celui qui permet de « voir au mieux » les individus, c'est à dire celui pour lequel « la variance des individus est maximale » ; cet indice est appelé « première composante principale » ou « premier axe principal ». Une certaine proportion de la variation est expliquée par cette composante principale.

Une deuxième composante principale est recherchée à condition qu'elle soit non corrélée avec la première et qu'elle soit à son tour la plus grande variance (Dervin, 1992).

Cette deuxième composante principale ou « deuxième axe principal » fournit la plus grande information possible complémentaire de la première.

Le processus se poursuit jusqu'à l'obtention de la dernière composante principale, la part d'information expliquée par chacune d'elles devenant de plus en plus faibles.

Pour mieux observer les individus, il ne reste plus qu'à construire le plan à partir de deux composantes principales qui sont des variances maximales sous contrainte de non corrélation entre elles.

La méthode de l'ACP repose sur la diagonalisation de l'une des deux matrices :

- matrices des corrélations (on utilise des données centrées réduites lorsque les tableaux seront constitués de variables de différentes natures ou caractérisées par des unités différentes, c'est le cas le plus général). dans ce travail nous allons utiliser les données centrées réduites (normées) afin de donner le même poids aux différentes variables.
- matrices des variances – covariances (on utilise les données centrées lorsque toutes les variables seront exprimées dans les mêmes unités, sans oublier que ce sont les variables les plus dispersées qui auront le plus de poids).

2.2/ Système d'information géographique : SIG

Un système d'information géographique peut être définie comme un système de gestion de base de données conçu pour saisir, stocker, manipuler, analyser et afficher des données à référence spatiale en vue de résoudre des problèmes complexes de gestion et de planification.

Un tel système devra normalement inclure les composantes qui sont relatives à :

- l'acquisition des données d'entrées ;
- stockage, à la récupération et à la gestion de base de données ;
- la manipulation et à l'analyse des données ;
- l'affichage et à la génération de produits ;
- une interface à l'utilisateur.

Chapitre 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

I/ Isolement et purification :

Les souches isolées proviennent des laits d'une seule traite (traite matinale). Au total 66 échantillons de laits de vache, de chèvre et de brebis ont été prélevés dans le périmètre du moyen Cheliff durant les trois saisons : hiver, printemps et été.

24 échantillons contaminés ont été écartés. Seuls les échantillons sains ont été retenus pour constituer la base de l'isolement des souches locales sur milieu M17. Du total des échantillons prélevés, 42 souches ont pu être isolées. De plus, un isolement à partir de ferments industriels fournis par l'unité de ARRIBS nous a servi de référence.

II/ Identification des souches :

II.1/ Etudes des caractères cultureux et morphologiques

Selon Petranxscienne et Lapid (1981), toutes les colonies prélevés à partir du milieu M17 et qui sont rondes ou lenticulaires, à contour régulier, d'un blanc opaque peuvent être des lactocoques.

L'observation macroscopique des cultures sur gélose M17, révèle la présence de colonies de formes rondes, de couleurs blanchâtres, lisses et légèrement bombées (figure 12).

Seuls les bactéries Gram positive et catalase négatif qui se présentent sous forme de coques isolées, en paires ou en chaînettes sont retenues.

Le tableau 16 rapporte toutes les observations macroscopiques et microscopiques des souches isolées des différents laits et du ferment lyophilisé qui a servi de référence.

Tableau 16: Caractères macroscopiques et microscopiques des souches isolées.

Origine	Nombre	Aspect des colonies	Aspect des cellules	mode de regroupement	Type de la paroi
Lait cru de vache, chèvre et de brebis	42	- Blanches - Rondes ou lenticulaires - A contours réguliers.	Coques ou en chaînettes	- Coques isolées - Diplocoques - Chaînettes	Gram +
Ferment lyophilisé	2	-Rondes -Blanches	Coques ou en chaînettes	- Coques isolées - Diplocoques - Chaînettes	Gram +

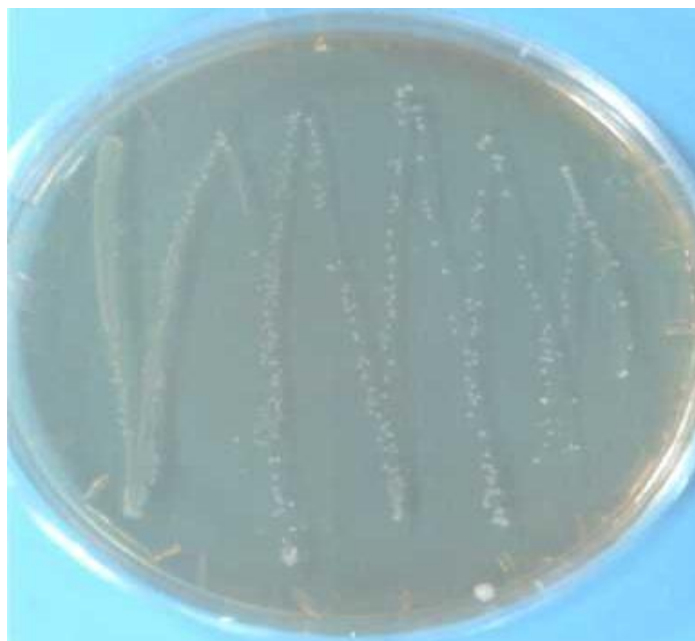


Figure 12 : Isolement des lactocoques sur milieu M17

II.2/ Etudes des caractères biochimiques et physiologiques des souches :

Les critères utilisés pour déterminer l'espèce et la sous espèce et les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 17, 18, 19 et 20 suivis des auxanogrammes des souches isolées figurent dans les tableaux 21, 22, 23 et 24. Les résultats de quelques tests biochimiques sont illustrés sur les figures 13, 14, 15 et 16.

Tableau 17 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de vache durant les différentes saisons.

Origine du lait	Lait de vache										
	Hiver			Printemps					Eté		
Caractère/ Souches	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V4	V5	V1	V2	V3
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ
Croissance à :											
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A
Type fermentaire	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F
Croissance à :											
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilié	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Résistance 30 mn à 63°C	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance sur lait de Sherman	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Résistance au tellurite	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citratase	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Lait tournoilé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espèce	Lc.L1	Lc.L2	Lc.C1	Lc.L5	Lc.L6	Lc.D1	Lc.L7	Lc.L8	Lc.L10	Lc.L11	Lc.D4

Tableau 18 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de chèvre durant les différentes saisons.

<i>Origine du lait</i>	Lait de chèvre					
	<i>Hiver</i>		<i>Printemps</i>		<i>Été</i>	
<i>Saisons</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>
<i>Caractère/ Souches</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>
Gram	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	γ	γ	γ	γ	γ	γ
Croissance à :						
10°C	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A
Type fermentaire	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F	H.F
Croissance à :						
2%	+	+	+	+	+	+
4%	-	-	+	-	+	+
6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilié	+	-	+	-	+	-
Résistance 30 mn à 63°C	-	-	-	+	-	-
Croissance sur lait de Sherman	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	-	-	+	-	-	-
Résistance au tellurite	+	-	-	-	+	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-
Citratase	-	-	+	-	-	-
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-
Espèce	<i>Lc.L3</i>	<i>Lc.L4</i>	<i>Lc.D2</i>	<i>Lc.L9</i>	<i>Lc.L12</i>	<i>Lc.L13</i>

Tableau 19 : Résultats d'identification des lactocoques isolées dans le périmètre du moyen Cheliff à partir du lait de brebis durant les différentes saisons.

<i>Origine du lait</i>	<i>Lait de brebis</i>			
<i>Saisons</i>	<i>Hiver</i>	<i>Printemps</i>		<i>Eté</i>
<i>Caractère/ Souches</i>	<i>B1</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B1</i>
Gram	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Hémolyse	γ	γ	γ	γ
Croissance à :				
10°C	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6	-	-	-	-
Type respiratoire	A-A	A-A	A-A	A-A
Type fermentaire	H.F	H.F	H.F	H.F
Croissance à :				
2%	+	+	+	+
4%	-	+	-	+
6,5% de NaCl	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilié	-	-	+	-
Résistance 30 mn à 63°C	-	-	-	+
Croissance sur lait de Sherman	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	+	+	+	-
Résistance au tellurite	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-
Citratase	+	+	+	-
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-
Espèce	<i>Lc.C2</i>	<i>Lc.C3</i>	<i>Lc.D3</i>	<i>Lc.L14</i>

Tableau 20 : Résultats d'identification des ferments lyophilisés

Caractère/ Souches	S11	S12
Gram	+	+
Oxydase	-	-
Catalase	-	-
Hémolyse	γ	γ
Croissance à :		
10°C	+	+
30°C	+	+
45°C	-	-
Croissance à pH 9,6	+	+
Type respiratoire	A-A	A-A
Type fermentaire	H.F	H.F
Croissance à :		
2%	+	+
4%	-	+
6,5% de NaCl	-	-
Croissance sur milieu bilité	-	-
Résistance 30 mn à 63°C	-	-
Croissance sur lait de Sherman	+	+
Hydrolyse de l'arginine	-	+
Résistance au tellurite	-	-
Gélatinase	-	-
Citratase	-	+
Lait toumesolé	ARC	ARC
Hydrolyse de l'amidon	-	-
Espèce	<i>Lc.L*</i>	<i>Lc.C*</i>

Symboles :

+: Réaction positive ; -: réaction négative ; A : acidification ; R : réduction ; C : coagulation ; A-A : aéro-anaérobie ; H.F : homofermentaire.

V : bactérie lactique présumée lactocoque isolée à partir du lait de vache.

B : bactérie lactique présumée lactocoque isolée à partir du lait de brebis.

C : bactérie lactique présumée lactocoque isolée à partir du lait de chèvre.

S1 et S2 : bactéries lactiques présumées lactocoques isolées à partir du ferment lyophilisé.

Tableau 21 : Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de vache

Lait de vache											
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Maltose	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Mélibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Xylose	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Célobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Espèce	<i>Lc.L1</i>	<i>Lc.L2</i>	<i>Lc.L5</i>	<i>Lc.L6</i>	<i>Lc.L7</i>	<i>Lc.L8</i>	<i>Lc.L10</i>	<i>Lc.L11</i>	<i>Lc.C1</i>	<i>Lc.D1</i>	<i>Lc.D4</i>

Tableau 22: Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de chèvre

Lait de chèvre						
Lactose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	+	+
Maltose	-	-	-	+	-	-
Mélibiose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-	-
Xylose	-	-	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	+
Célobiose	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+
Espèce	<i>Lc.L3</i>	<i>Lc.L4</i>	<i>Lc.L9</i>	<i>Lc.D2</i>	<i>Lc.L12</i>	<i>Lc.L13</i>

Tableau 23 : Auxanogramme des souches isolées à partir du lait de brebis

	Lait de brebis			
Lactose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	-
Mélibiose	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Raffinose	-	-	+	-
Xylose	-	-	+	-
Mannitol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	+	+
Célobiose	+	+	+	+
Inositol	-	-	+	+
Espèce	<i>Lc.C2</i>	<i>Lc.C3</i>	<i>Lc.D3</i>	<i>Lc.L14</i>

Tableau 24 : Auxanogramme des ferments lyophilisés.

	Lactose	Glucose	Galactose	Maltose	Mélibiose	Sorbitol	Raffinose	Xylose	Mannitol	Arabinose	Tréhalose	Célobiose	Inositol	Espèce
S1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	<i>Lc.L*</i>
S2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Lc.C*</i>

Symboles :

+ : Réaction positive ; *-* : réaction négative.

Les résultats montrent que toutes les souches de *Lactococcus lactis* sont capables de croître à 10 °C mais pas à une température supérieure à 40 °C.

Selon Rallu *et al.*, (2000), les souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* sont plus résistantes aux stress et peuvent se développer à 40 °C, à un pH de 9,2 et en présence d'une concentration en NaCl de 4%, contrairement aux souches de *Lc. cremoris*. De plus :

Toutes les souches locales isolées sont

- incapables d'hydrolyser l'amidon ;
- incapables de croître à un pH de 9,6 ;
- incapables de croître à des concentrations de sel de 6,5 % ;
- capables de croître à des concentrations de sel de 2 % ;
- Presque la totalité des sous espèces *lactis biovar diacetylactis* peuvent croître à des concentrations de sel de 4 % ;
- Une seule sous espèce *cremoris* peut croître à des concentrations de sel de 4 %

Les résultats des auxanogrammes des souches isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis montrent que ses souches locales peuvent métaboliser le lactose, le glucose et le galactose ; caractéristique recherchée lors de la production fromagère. Exception faite pour la sous espèce *diacetylactis* qui ne métabolise pas le galactose. Certaines souches ont la faculté de pouvoir métaboliser le maltose, caractéristique recherchée pour les levains lactiques destinés à la panification.

Le groupe de levain mésophiles, auquel les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait (production d'acide lactique), à travers leur métabolisme homofermentaire, du glucose, lactose et le galactose.



Figure 13 : Résultat du test de la citratase



Figure 14 : Résultat du test de fermentation sur milieu complexe



Figure 15 : Résultat du test de fermentation du galactose



Figure 16 : Résultat du test du lait de Sherman

Au terme de cette identification nous avons pu isoler 21 souches au niveau du périmètre du moyen Chellif réparties comme suit :

- 14 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* ;
- 03 souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* ;
- 04 souches de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*.

Les souches S1 et S2 sont des ferments industriels correspondant à *Lactococcus lactis subsp lactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris* respectivement

Globalement les souches isolées de *Lactococcus lactis* représentent 66,66 % pour la sous espèce *lactis*, 14,30 % pour la sous espèce *cremoris* et 19,04 % pour la sous espèce *lactis biovar diacetylactis*. La distribution centésimale des sous espèces par type de lait est reportée dans le tableau 25.

Tableau 25: Distribution moyenne centésimale des sous espèces dans les différents laits de vache, de chèvre et de brebis

Sous espèce	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait de brebis
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	72,72 %	83,33 %	25,00 %
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> .	9,09 %	0 %	50,00 %
<i>Lactococcus lactis subsp diacetylactis</i>	18,18 %	16,67 %	25,00 %

Le profil de distribution des sous espèces par type de lait montre :

- Une Dominance de la sous espèce *lactis* dans le lait de vache et de chèvre
- Une Dominance de la sous espèce *cremoris* dans le lait de Brebis
- Dominance de la sous espèce *diacetylactis* le lait de Brebis

Les laits de vache, de chèvre et de brebis ont des compositions chimiques différentes. Comme conséquences, la répartition des souches ainsi que leur aptitude à croître dans ces laits ne sont pas identiques (Desmazeaud, 1994)

L'isolement des souches de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris* s'est révélée difficile sauf peut être pour *Lactococcus lactis subsp lactis* qui était aisément isolée car elles sont selon Deroissart, (1986) et Sandine, (1988) non exigeantes sur le plan nutritionnel et de ce fait dominantes dans le lait cru.

La croissance des lactocoques sur le lait se fait surtout à partir des oligopeptides libérés lors de la protéolyse de la caséine (Juillard et al., 1995).

Pour la sous espèce *cremoris*, c'est surtout la caséine β et la caséine κ qui permettent sa croissance optimale. Ceci explique sa présence fréquente dans le lait de brebis qui se distingue des deux autres laits (vache et chèvre) par une richesse supérieure en matières grasses, en caséines α_s , β et κ et en éléments minéraux (calcium et phosphore).

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 17, 18, 19, 20, 21 et 22.

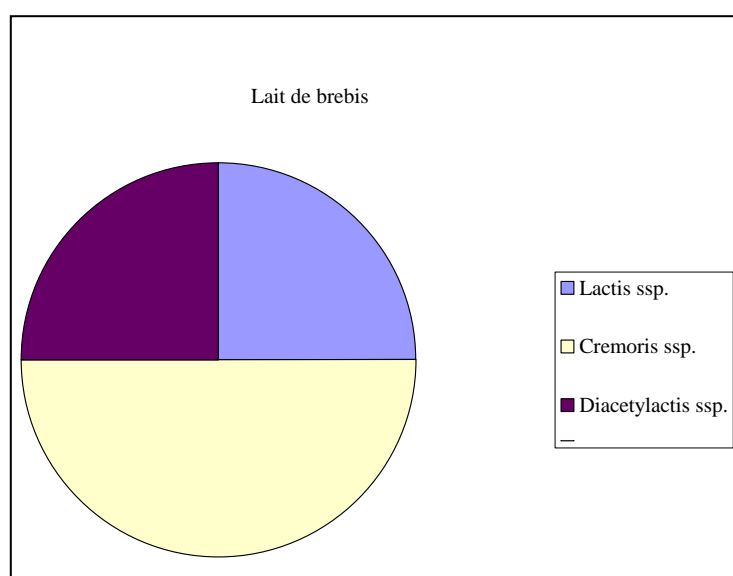


Figure 17 : distribution moyenne des souches dans le lait de brebis

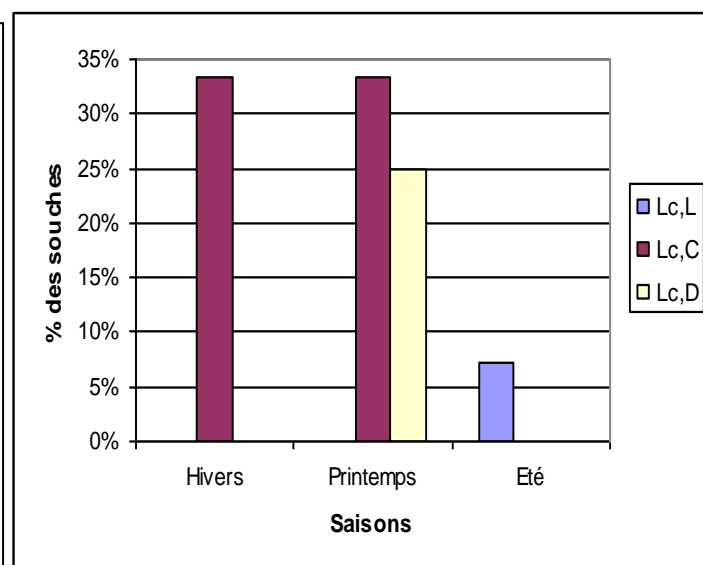


Figure 18 : distribution des souches dans le lait de brebis en fonction des saisons

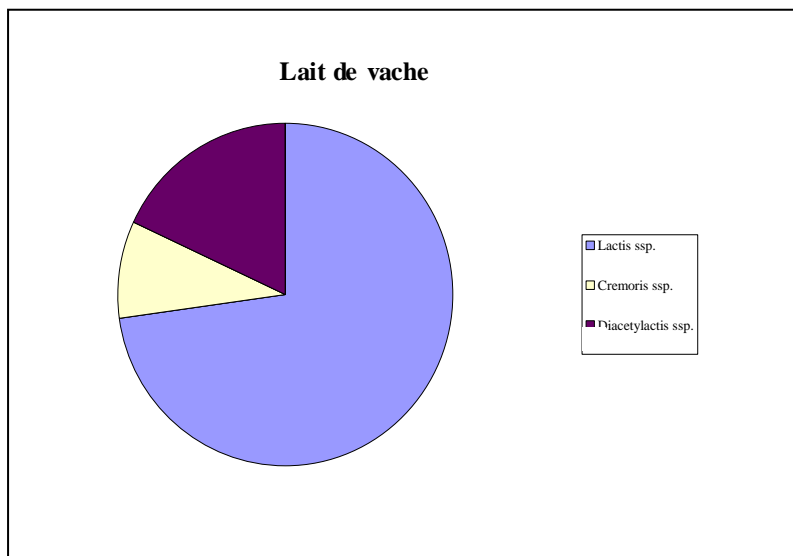


Figure 19 : distribution moyennes des souches dans le lait de vache

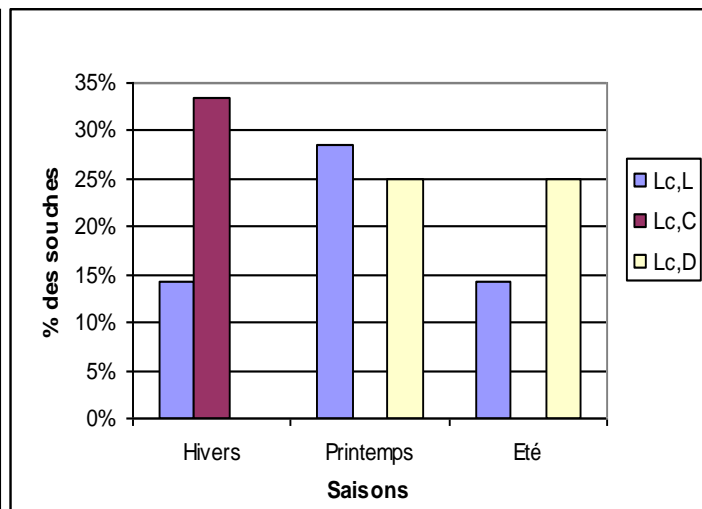


Figure 20 : distribution des souches dans le lait de vache en fonction des saisons

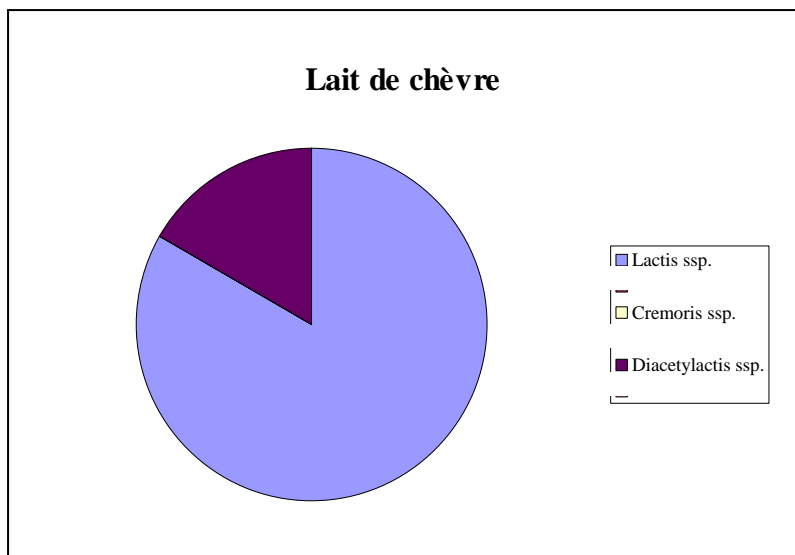


Figure 21 : Distribution moyenne des souches dans le lait de chèvre

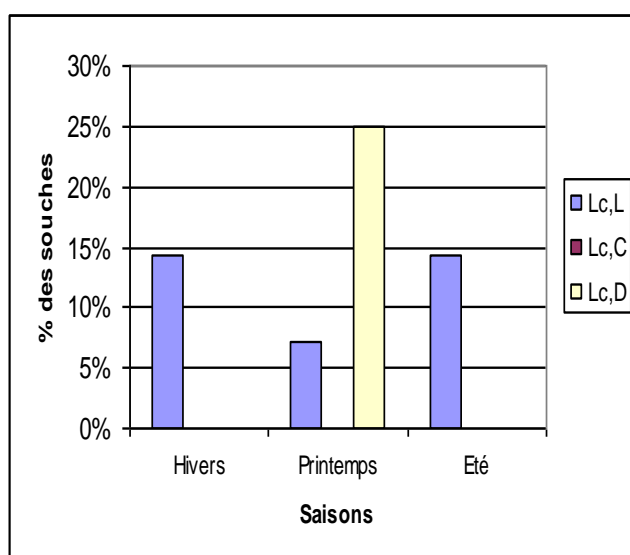


Figure 22 : Distribution des souches dans le lait de chèvre en fonction des saisons

Les résultats d'une enquête menée par Michel.V et *al.*,(2001) chez tous les producteurs laitiers en France montrent que leurs pratiques diffèrent pour le lavage du matériel de traite et les soins apportés aux mamelles avant et après la traite. Ces pratiques et leurs combinaisons influent sur le niveau des populations microbiennes et la population entre les flores d'intérêt technologique et les flores d'altération.

Les travaux effectués ces dernières années tendent à montrer que les flores d'intérêt technologique sont apportées préférentiellement par les trayons ou par l'air au cours de la traite. Ainsi, l'environnement en contact avec le trayon est à privilégier (pratiques au tours du paillage, autours des trayons : essuyage sans désinfection des trayons, pas de post trempage systématique) (Tormo et *al.*, 2006)

D'autres études montrent que la composition du lait varie d'une saison à une autre. Cette variation est au niveau glucidique, protéique et lipidique. Elle est à l'origine de la persistance saisonnière de ces souches (Morel et *al.*, 2006)

II.3/ Aptitudes technologiques des souches :

II.3.1/ Le pouvoir pathogène :

Différentes souches de bactéries lactiques sont soupçonnées d'être à l'origine de la formation d'amines biogènes (Gonzalez et *al.*, 1998) dans les fromages. Les systèmes enzymatiques de ces bactéries sont capables de décarboxyler des acides aminés (histidine, tyrosine, etc.) et de former des composés (histamine, tyramine, etc.) à l'origine d'allergie s'ils sont consommés en quantités importantes. L'histamine, résultante de la décarboxylation de l'histidine, est l'amine la plus toxique dont certaines bactéries lactiques se trouve parmi les germes les plus souvent incriminés dans sa genèse (Guiraud, 1998). Les résultats trouvés sont consignés dans le tableau 26

Tableau 26 : Détermination de la variation du pH avec et sans Histidine après 24 h d'incubation

Souches	pH en présence de l'histidine.	pH en absence de l'histidine après 24 h.
<i>Lc. L1</i>	4,24	4,21
<i>Lc. L2</i>	4,30	4,30
<i>Lc. L3</i>	4,36	4,35
<i>Lc. L4</i>	4,26	4,24
<i>Lc. L5</i>	4,35	4,35
<i>Lc. L6</i>	4,36	4,32
<i>Lc. L7</i>	4,46	4,46
<i>Lc. L8</i>	4,45	4,45
<i>Lc. L9</i>	4,39	4,42
<i>Lc. L10</i>	4,45	4,46
<i>Lc. L11</i>	4,37	4,37
<i>Lc. L12</i>	5,05	5,15
<i>Lc. L13</i>	5,12	5,10
<i>Lc. L14</i>	5,24	5,20
<i>Lc. L*</i>	4,20	4,20
<i>Lc. C1</i>	4,12	4,15
<i>Lc. C2</i>	4,88	4,88
<i>Lc. C3</i>	4,47	4,50
<i>Lc. C*</i>	4,34	4,38
<i>Lc. D1</i>	4,12	4,00
<i>Lc. D2</i>	4,25	4,21
<i>Lc. D3</i>	4,05	4,10
<i>Lc. D4</i>	4,28	4,25

Les variations du pH sont négligeables et quasi nulles pour l'ensemble des souches. Ceci indique qu'aucune souche n'est à l'origine de la formation d'histamine après 24 heures d'incubation. Et donc n'est pathogène

II.3.2/ L'antibiorésistance :

La présence d'antibiotiques dans les laits (pénicilline, vancomycines, etc) peut être due au traitement des mammites. La plupart des bactéries y sont sensibles.

Il n'est pas souhaitable de sélectionner, dans la composition des ferments, des souches résistantes aux antibiotiques, car ingérées par l'homme, elles sont susceptibles de transférer ces caractères aux autres bactéries du tube digestif. De plus, l'augmentation de l'ingestion d'antibiotiques par l'homme peut entraîner des risques d'allergie. Enfin, des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent avoir, en plus, perdu certaines de leurs caractéristiques originelles.

Le test d'antibiogramme des souches de *Lactococcus lactis* nous a permis de déterminer la sensibilité ou la résistance de ces souches vis à vis de quelques antibiotiques les plus usuels.

Les antibiotiques testés appartiennent aux familles suivantes : β -lactamines (Pénicilline, oxacilline et ampicilline), macrolides (érythromycines). Les résultats de ces tests sont regroupés dans le tableau 27

Tableau 27 : Résultats de test d'antibiogramme des souches de *Lc.lactis*

Souches	Pénicilline V	Oxacilline	Ampicilline	Erythromycine
<i>Lc. L1</i>	S	R	R	L
<i>Lc. L2</i>	S	R	S	R
<i>Lc. L3</i>	S	S	R	S
<i>Lc. L4</i>	R	S	S	S
<i>Lc. L5</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L6</i>	S	L	L	R
<i>Lc. L7</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L8</i>	R	S	S	S
<i>Lc. L9</i>	R	S	S	S
<i>Lc. L10</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L11</i>	S	L	R	R
<i>Lc. L12</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L13</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L14</i>	S	S	S	S
<i>Lc. L*</i>	S	S	S	S
<i>Lc. C1</i>	L	S	S	S
<i>Lc. C2</i>	L	S	S	S
<i>Lc. C3</i>	S	S	S	S
<i>Lc. C*</i>	S	S	S	S
<i>Lc. D1</i>	S	S	R	R
<i>Lc. D2</i>	S	S	S	S
<i>Lc. D3</i>	R	S	S	S
<i>Lc. D4</i>	S	S	S	S

Nous remarquons ce qui suit :

- Les souches *Lc. L5*, *Lc. L7*, *Lc. L10*, *Lc. L12*, *Lc. L13*, *Lc. L14*, *Lc. D2*, *Lc. D4* et *Lc. C3* sont sensibles vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques
- La souche *Lc. L1* est résistante à l'oxacilline et l'ampicilline
- Les souches *Lc. D1* et *Lc. L11* sont résistantes à l'érythromycine et l'ampicilline
- Les souches industrielles sont sensibles à tous les antibiotiques testés

II.3.3/Activité protéolytique :

L'activité protéolytique est nécessaire au métabolisme azoté des bactéries lactiques et intervient sur les caractéristiques des produits laitiers fermentés. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 28

Tableau 28 : Mesure de l'activité protéolytique des cultures pures de *Lactococcus lactis* à 30 °C sur lait de Sherman après 24 heures d'incubation

Souches	Activité protéolytique
<i>Lc.L1</i>	AAP
<i>Lc.L2</i>	AAP
<i>Lc.L3</i>	AAP
<i>Lc.L4</i>	AP
<i>Lc.L5</i>	P
<i>Lc.L6</i>	AP
<i>Lc.L7</i>	AAP
<i>Lc.L8</i>	AAP
<i>Lc.L9</i>	AAP
<i>Lc.L10</i>	AP
<i>Lc.L11</i>	AP
<i>Lc.L12</i>	/
<i>Lc.L13</i>	AP
<i>Lc.L14</i>	/
<i>Lc.C1</i>	AAP
<i>Lc.C2</i>	AP
<i>Lc.C3</i>	AP
<i>Lc.C*</i>	AAP
<i>Lc.D1</i>	AP
<i>Lc.D2</i>	AAP
<i>Lc.D3</i>	P
<i>Lc.D4</i>	AP

A : acidification ; **A** : alcalinisation ; **P** : peptonisation ; / : pas de modification

Le système protéolytique des bactéries est constitué, de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases. L'efficacité du système chez une souche sauvage (prt+) de *Lactococcus lactis subsp.lactis* lui permet de se développer avec un temps de génération de 30 mn à 30°C (Détmers et al., 2000).

La croissance de plusieurs souches de *Lactococcus lactis subsp.cremoris* dans le lait apparaît limitée par la faible vitesse de la protéolyse des caséines du lait : les acides aminés les plus limitants étant la L-leucine et la l-phénylalanine. La limitation de la croissance dans le

lait serait plutôt dû à la faible disponibilité de di ou tripeptidases contenant ces deux acides aminés (Christensen et al, 1999).

En plus de son action sur la coagulation du lait lors de la croissance des bactéries lactiques, la protéolyse d'origine bactérienne est essentielle à l'affinage des fromages par le développement des saveurs (Law, 1984) et de la texture. La protéolyse peut produire des peptides (PM : 1 à 12 K Da) responsables de l'amertume de certains fromages durs ou semi durs.

II.3.4/ Production du diacétyle :

Les composés responsables de l'arôme des divers produits laitiers sont nombreux parmi lesquelles le diacétyle, l'acétaldéhyde et probablement le CO₂ et l'acétate sont les plus importants.

Certains auteurs Camus et al., (1951) attribuent cette faculté également à l'acétoïne. Par contre, d'autres auteurs (Cogan, 1980 ; Sharp, 1978) affirment que l'acétoïne n'a ni saveur ni odeur.

Tous les composés aromatiques résultant de la dégradation du citrate qui, même n'étant présent dans le lait qu'en faible quantité (environ 8,3 mM) ils n'en représentent pas moins un constituant clef (Cogan, 1980).

Le diacétyle et l'acétoïne sont presque toujours étudiés ensemble. Ils sont très liés puisque le diacétyle donne par réduction l'acétoïne. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, seul le diacétyle est aromatisant, ce qui justifie notre intérêt à cette substance.

Les souches que nous avons retenues pour cette activité sont évidemment celles qui produisent du diacétyle en quantité appréciables; c'est le cas des souches de *Lactococcus lactis biovar diacetylactis*.

Les quatre souches de *Lc.lactis diacetylactis* ont été cultivées sur milieu M17 à 21°C pendant 24 h puis inoculées à raison de 3 % (10⁶ UFC/ml) dans 100 ml de différents laits vache, chèvre et brebis.

Les flacons ainsi inoculés sont mis à incuber à 21 °C. Le choix de cette température est basé sur l'hypothèse émise par Bassit, (1994).

Selon Bassit et *al.*, (1994) qui ont étudiée l'effet de la température sur la production du diacétyl, à partir d'une culture pure de *Lc. diacetylactis* CNRZ 483, que la production de diacétyl était plus élevée à la température de 18 et 21 °C que celle de 30 °C. par contre, Oberman et *al.*, (1982) montrent que la production du diacétyl augmente de 30 % quand la température de culture augmente de 23 °C à 28 °C en culture mixte.

Cette contradiction est probablement due au fait que, dans une culture mixte, la cinétique de production du diacétyl est différente de celle d'une culture pure de *Lc. diacetylactis*. La concentration en diacétyl est déterminée par comparaison avec une droite étalon établie avec du diacétyl pure dans l'intervalle de 0 à 3 ppm. Le témoin utilisé pour établir le zéro du spectrophotomètre est un lait nonensemencé et traité dans les mêmes conditions que les cultures à tester pour la production du diacétyl. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont représentés dans le tableau 29

Tableau 29: Production du diacétyl par les souches *Lc. D1*, *Lc. D2*, *Lc. D3* et *Lc. D4* sur différents laits

	<i>Lc. D1</i>		<i>Lc. D2</i>		<i>Lc. D3</i>		<i>Lc. D4</i>	
	DO après 17 h	Equivalent en diacétyl	DO après 17 h	Equivalent en diacétyl	DO après 17h	Equivalent en diacétyl	DO après 17 h	Equivalent en diacétyl
Lait de vache	0,225	0,90	0,358	2,27	0,291	1,164	0,498	2,73
Lait de chèvre	0,199	0,80	0,306	1,242	0,203	0,81	0,266	1,74
Lait de brebis	0,09	0,65	0,274	1,097	0,246	0,98	0,312	1,63

Tandis que les valeurs maximales que nous avons enregistrées sont celles des souches *Lc. D2* et *Lc. D4* sur lait de vache correspondant respectivement à 2,27 et 2,73 ppm après 17 h de culture. Les souches *Lc. D1* et *Lc. D3* ont marqué des valeurs plus faibles. Les valeurs de diacétyl notées sur lait de vache sont supérieures à celles retrouvées sur les laits de chèvre et lait de brebis (figure 23).

La valeur maximale trouvée dans ce travail (2,73 ppm) reste faible par rapport à celle enregistrée par un ferment industrielle de *Lc. diacetylactis* # 2405 cultivée sur lait de vache et qui a atteint 21,7 ppm. Par ailleurs, comparée la souche étudiée à une autre souche mésophile aromatisante qui est *Leuconostoc cremoris*, Cogan ,(1980) trouve que le maximum de diacétyl produit est de 6 ppm dans un milieu enrichi de 0,3 % d'extrait de levure.

On remarque que la souche *Lc. D2* qui est la plus acidifiante débute la production du diacétyle après 6 h de culture contrairement à la souche *Lc. D4* qui ne débute sa production qu'après 9 h de culture, signalons que cette souche est moins acidifiante que la précédente.

Le diacétyle produit a été estimé après 9 h de cultures pour les autres souches étudiées (figure 23). Après 17 à 18 h on assiste à une production maximale de diacétyle. Au delà de cette durée la teneur en diacétyle décroît progressivement en raison de l'activité de la diacétyle- réductase enzyme impliquée dans la réduction du diacétyle en acétoïne cette réaction est irréversible.

La formation de diacétyle ne débute que tardivement, ce phénomène a déjà été remarqué par certains auteurs ; on peut l'expliquer par le fait que les souches de *Lc. diacetylactis*, étant de pouvoir acidifiant faible mettent un certain temps (entre 6 et 9 h) pour abaisser le pH à un niveau favorable à la production du diacétyle. Desmazeaud, (1983) note à ce sujet ; la première enzyme induite dans le métabolisme du citrate, la citrate perméase, est pH dépendante, elle est fonctionnelle aux pH inférieure à 6. Par ailleurs, Sharpe, (1978) a trouvé que l'utilisation du citrate était plus active à des pH plus acides et en application pratique dans la composition des levains mixtes, en associant des souches grandes productrices d'acide avec *Lc. diacetylactis* afin d'obtenir de grandes quantités de diacétyle.

C'est ce que nous avons voulu vérifier en suivant la production du diacétyle pour les deux souches *Lc. D4* et *Lc. L9*. Cela nous permettra de superposer la production de diacétyle à celle de l'acidité pour ces deux souches (tableau 30)

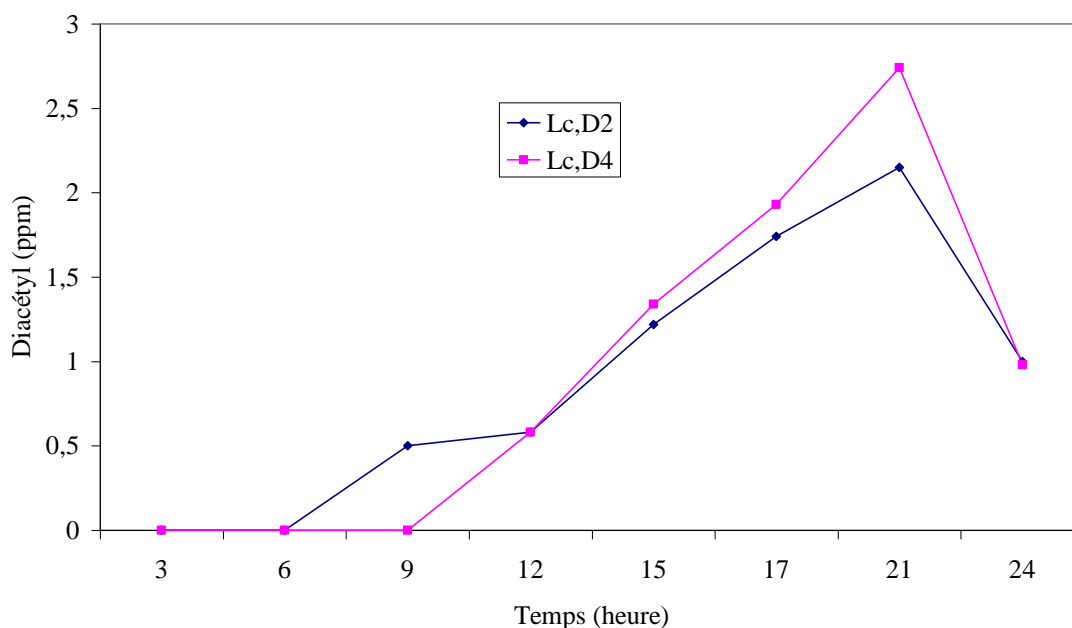


Figure 23 : Production de diacétyl par les souches Lc, D2 et Lc, D4 en culture pure sur Lait de vache

Tableau 30: Production de diacétyl et d'acide lactique par les souches *Lc. L9* et *Lc. D4* sur lait de vache

Mesures relevées après :	<i>Lc. L9</i>		<i>Lc. D4</i>	
	Acidité °D	diacétyl en ppm	Acidité °D	diacétyl en ppm
3 heures	22	-	21	-
6 heures	24	-	23	-
9 heures	35	0,50	32	0,42
12 heures	40	0,58	34	0,58
15 heures	45	1,22	35	1,34
17 heures	52	1,50	38	1,93
21 heures	68	1,00	40	2,74
24 heures	82	0,48	42	0,98

La valeur du diacétyl obtenue pour la souche *Lc. D4* en association avec la souche *Lc. L9* augmente de 0,01 ppm et débute plutôt par rapport à celle obtenue pour la même souche en culture pure (figures 24 et 25). Cogan, (1981) a remarqué que le maximum du diacétyl coïncide toujours avec la disparition des citrates, il en conclut l'existence d'un effet répressif des citrates sur la diacétyl – réductase. L'addition au lait de 0,15 % de citrate de

sodium pour retarder la réduction du diacétyl. D'après les résultats obtenus dans cette étude, l'addition de 0,20% de citrate de sodium au lait de vache ne semble pas stimuler la croissance de *Lc. diacetylactis* 4 et les valeurs de diacétyl obtenus en fin de croissance reste inchangées.

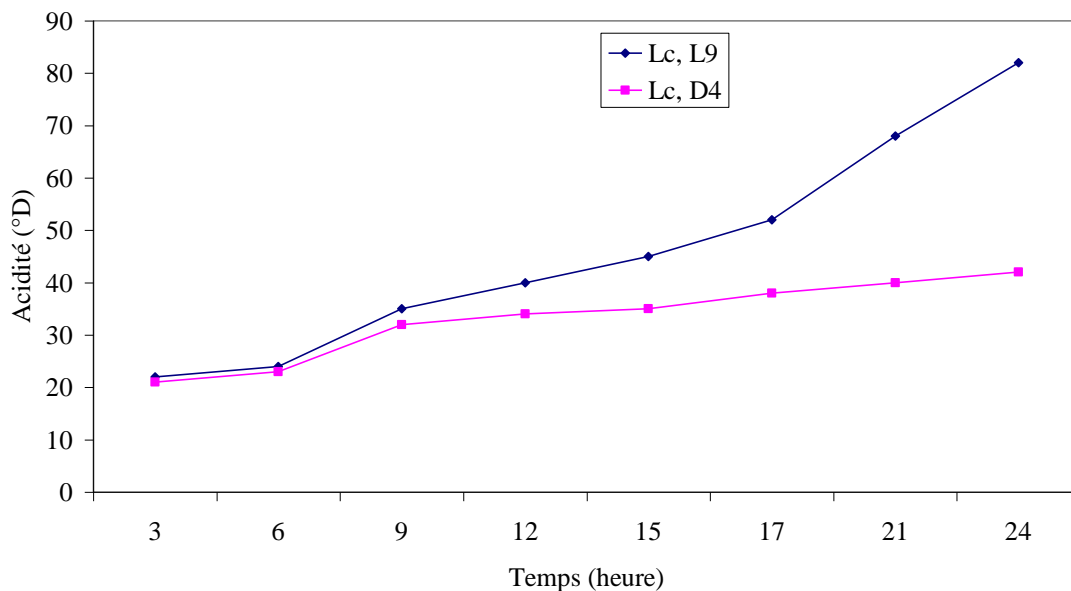


Figure 24 : Evolution de l'acidité des deux souches Lc, L9 et Lc, D4

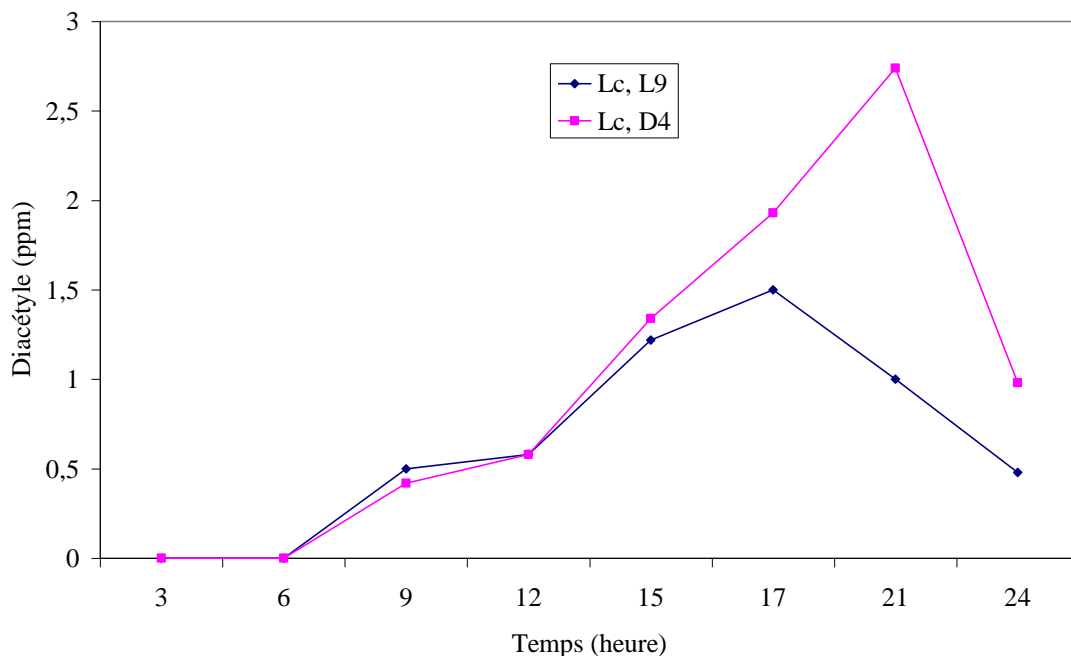


Figure 25: Evolution de la production de diacétyl des deux souches Lc, L9 et Lc, D4 en fonction du temps

II.3.5/ Evolution de la biomasse :

La mesure de la vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance ($\mu \text{ h}^{-1}$) reste un critère important dans l'appréciation des performances d'une souche microbienne. Ce paramètre est mesuré lors de la phase exponentielle de croissance tant que n'intervient pas un facteur limitant. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 31.

Tableau 31 : Résultats de la croissance des souches de cultures pures de *Lactococcus lactis* cultivées sur milieu M17 à 30 °C.

Souches	$\mu \text{ h}^{-1}$
<i>Lc. L1</i>	0,38
<i>Lc. L2</i>	0,38
<i>Lc. L3</i>	0,34
<i>Lc. L4</i>	0,37
<i>Lc. L5</i>	0,36
<i>Lc. L6</i>	0,35
<i>Lc. L7</i>	0,38
<i>Lc. L8</i>	0,36
<i>Lc. L9</i>	0,43
<i>Lc. L10</i>	0,38
<i>Lc. L11</i>	0,38
<i>Lc. L12</i>	0,37
<i>Lc. L13</i>	0,38
<i>Lc. L14</i>	0,36
<i>Lc. L*</i>	0,40
<i>Lc. C1</i>	0,35
<i>Lc. C2</i>	0,38
<i>Lc. C3</i>	0,33
<i>Lc. C*</i>	0,35
<i>Lc. D1</i>	0,33
<i>Lc. D2</i>	0,33
<i>Lc. D3</i>	0,33
<i>Lc. D4</i>	0,35

Un taux de croissance de $0,43 \text{ h}^{-1}$ est atteint par la souche *Lc. L9* relativement supérieure au taux atteint par notre souche de référence *Lc. L** qui est égale à $0,40 \text{ h}^{-1}$. Les autres souches de *Lc.lactis subsp lactis* ont marqué leur croissance par des taux de croissance allant entre $0,34$ et $0,38 \text{ h}^{-1}$ (voir annexe).

Des valeurs de taux de croissance beaucoup moindres ($\mu \leq 0,06 \text{ h}^{-1}$) sont obtenus après 24 h de croissance indiquant le début de la phase stationnaire (phase de décélération).

Comparativement à la souche industrielle de *Lactococcus lactis subsp cremoris* qui a atteint un taux de croissance de $0,35 \text{ h}^{-1}$, La souche localement isolée de *Lc. C2* a marqué un taux de croissance de $0,38 \text{ h}^{-1}$ et ceci est un avantage industriel qui peut être exploité. La phase de déclin pour ces sous espèces est annoncée par un taux de croissance ($\mu \leq 0,052 \text{ h}^{-1}$).

Quant aux souches de *Lc. lactis biovar diacetylactis* ont atteint des valeurs de taux de croissance plus faibles comparées aux autres souches ; exception faite pour la souche *Lc. D4* qui a marqué un taux de croissance élevé ($0,35 \text{ h}^{-1}$) et c'est une souche qui a un pouvoir acidifiant non négligeable.

En cours de fermentation, la multiplication des cellules est bloquée par l'acidité développée. La production du lactate commence pendant la phase exponentielle et se poursuit durant la phase stationnaire où la quantité d'acide lactique produite par des souches industrielles de *Lactococcus lactis* à la fin de la phase exponentielle était de $0,37 \%$ et qui atteint $0,57 \%$ pendant la phase stationnaire.

Le découplage entre la multiplication et la production d'acide semble lié à une sensibilité différente des réactions intervenantes dans la croissance et dans la glycolyse vis à vis des conditions du milieu.

Les lactocoques ont un pH optimal d'action de $6,5$ et un pH minimal de $4,5$ (De Roissart, 1986). Au dessous de pH $4,5$, l'activité et la stabilité de nombreuses enzymes sont fortement réduites (Choisy, 1987). Des pH plus inférieurs provoquent des dommages cellulaires (Novel, 1993).

II.3.6/ Pouvoir acidifiant :

L'acidité est une notion très importante pour l'industrie laitière, car elle permet de juger l'état de conservation du lait, en intervenant comme agent coagulant ou antimicrobien (Boudier, 1985). Elle est quantifiée par la mesure du pH ou par titration.

De ce fait, la caractérisation de nos souches est suivie par la mesure du pH et de l'acidité Dornic, en cultures pures dans les intervalles de temps de 2, 4, 6, 8 et 24 h à 30°C Les vitesses

d'acidification mesurées pour chaque culture pure après 4, 8 et 24 h d'incubation à 30 °C serviront à l'analyse statistique de nos données (Tableau 32).

Les mesures effectuées sur les souches importées et locales (Figure 26, 27, 28, 29 et 30) montrent qu'il existe une diversité d'activité acidifiante. La diversité de la vitesse d'acidification offre un choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques recherchées (Chamba et Prost, 1989). Une acidification trop lente ou trop faible est également à l'origine des défauts de qualités de certains produits fermentés. Elles provoquent notamment pour les fromages un égouttage insuffisant, un risque de contamination par d'autres flores ou un excès de lactose avec risque de post-acidification, entraînant des conséquences sur les qualités technologiques, sanitaires et organoleptiques du produit fini.

L'acidité du lait étant comprise entre 15 °D et 20 °D. Après 2 h d'incubation, elle reste presque inchangée pour la totalité des souches. Ceci correspond à la phase de latence nécessaire à leur adaptation aux conditions de culture. Au delà de cette phase, les souches présentent des niveaux d'acidité variables et c'est au cours de cette étape qu'on peut distinguer des différences entre les espèces et entre les souches de la même espèce.

Comparativement à la souche commerciale qui atteint une acidité de 86 °D après 24 h d'incubation, nos souches *Lc. L9* et *Lc. L13* sont légèrement plus acidifiantes à celle-ci. Elles atteignent des valeurs d'acidité respectives de : 89°D, 87 °D correspondant aux pH 4 et 4,10 respectivement avec des vitesses d'acidification différentes et les taux de croissance les plus élevés ($0,43 \text{ h}^{-1}$ et $0,38 \text{ h}^{-1}$). Ceci n'exclut pas l'importance des valeurs d'acidité atteintes par le reste des souches locales isolées de *Lactococcus lactis lactis* dont les valeurs d'acidité oscillent entre 69 °D et 85 °D.

En ce qui concerne les souches de *Lc. Lactis subsp cremoris* : *Lc.C1*, *Lc.C2*, *Lc C3* et *Lc.C** présentent des valeurs d'acidité de 57°D, 60 °D, 58 °D et 58°D respectivement. Tandis que, les souches de *Lc.lactis subsp diacetylactis* sont faiblement acidifiantes et leurs valeurs d'acidité ne dépassent pas 44 °D.

Nous constatons que les souches de *Lc.lactis subsp.lactis* sont plus acidifiantes que celles des sous espèces *Cremoris* et *diacetylactis*. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Cogan, (1980).

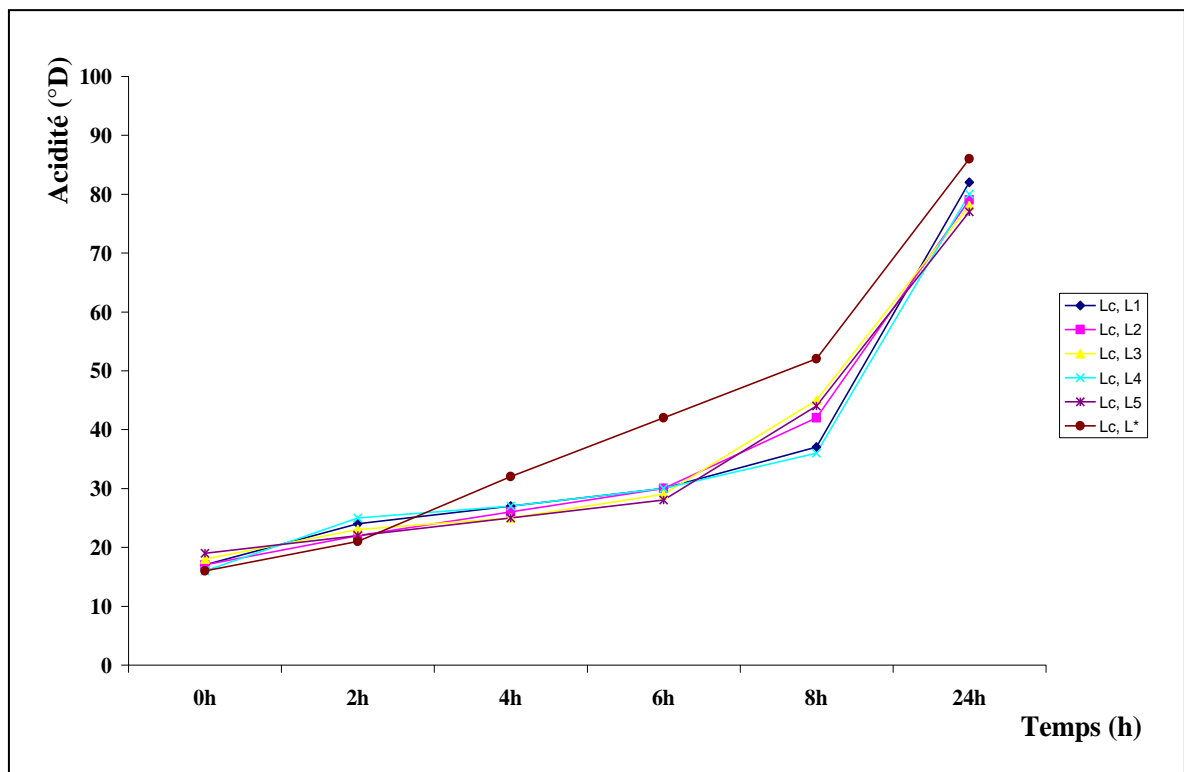


Figure 26 : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lc. L1*, *Lc. L2*, *Lc. L3*, *Lc. L4*, *Lc. L5* et *Lc. L**

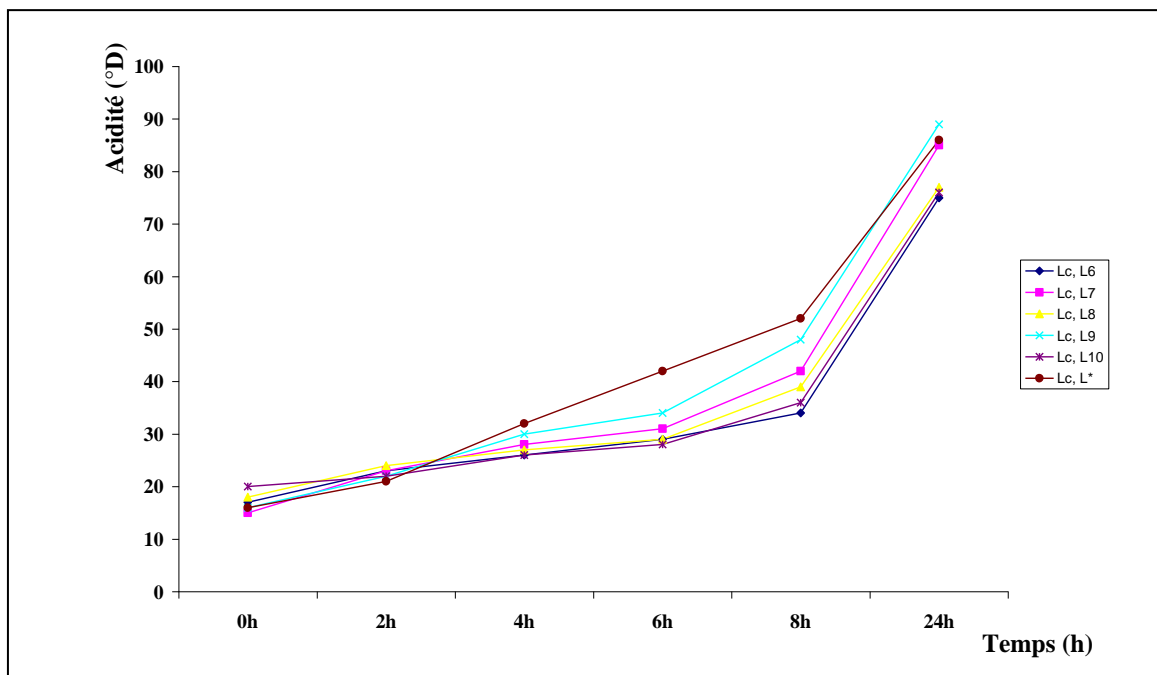


Figure 27 : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lc. L6*, *Lc. L7*, *Lc. L8*, *Lc. L9*, *Lc. L10* et *Lc. L**

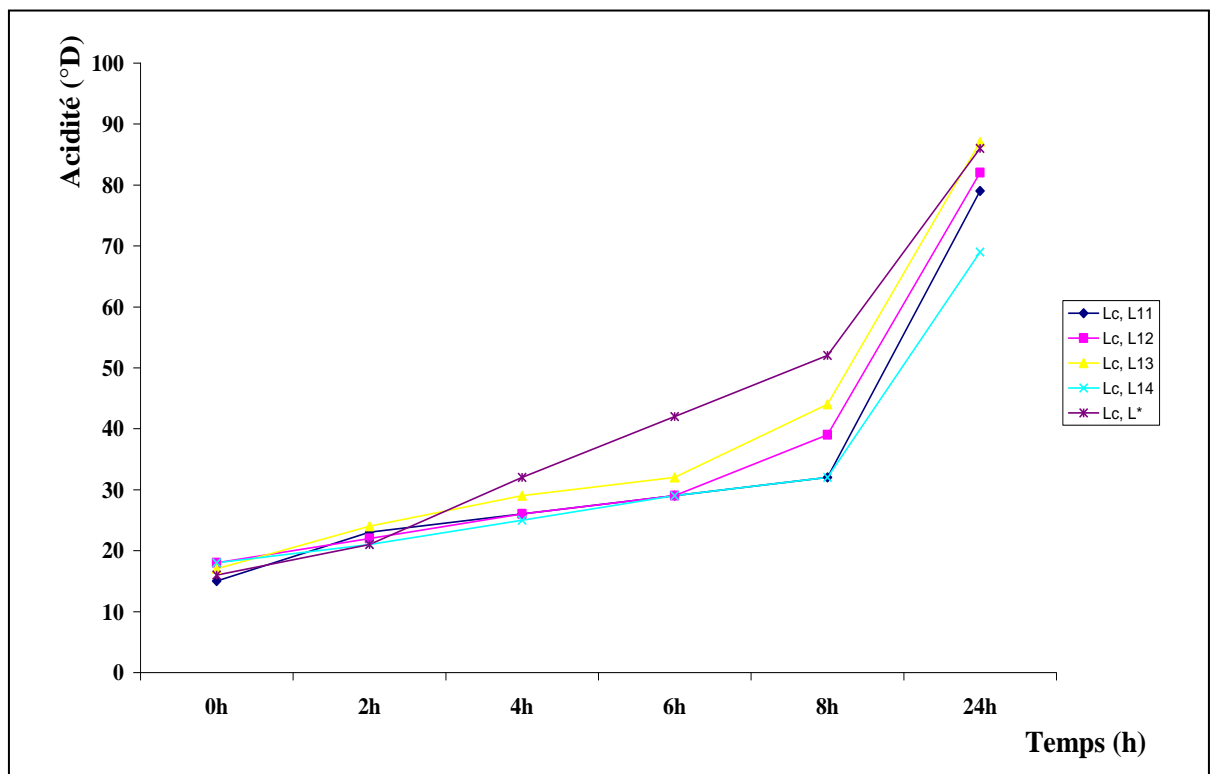


Figure 28 : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lc. L11*, *Lc. L12*, *Lc. L13*, *Lc. L14* et *Lc. L**

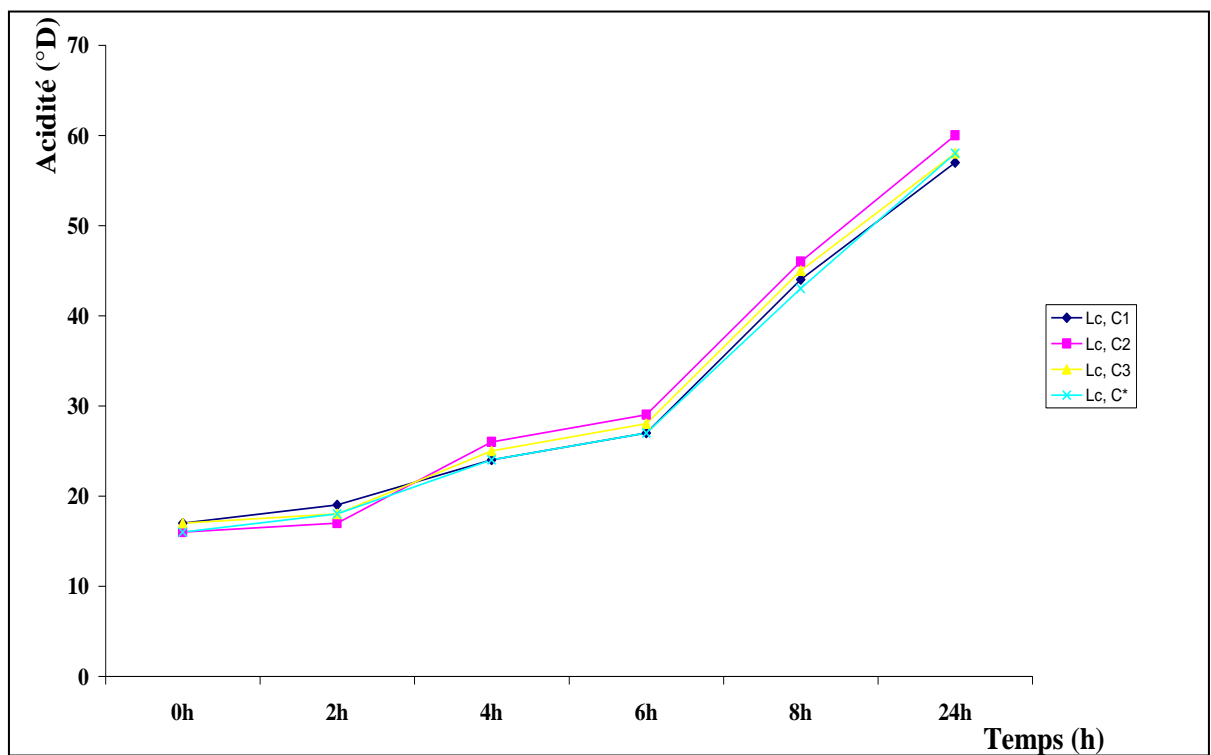


Figure 29: Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lc. C1*, *Lc. C2*, *Lc. C3* et *Lc. C**

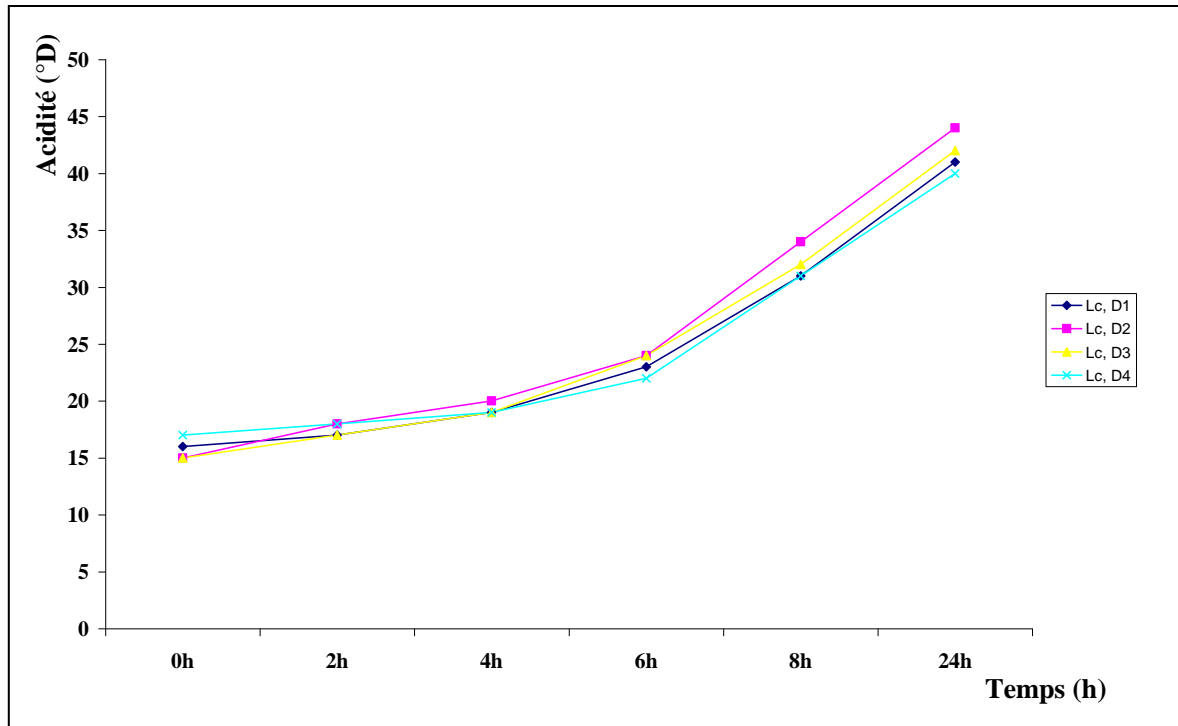


Figure 30 : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lc. D1*, *Lc. D2*, *Lc. D3* et *Lc. D4*

L'intérêt d'évaluer l'activité acidifiante des bactéries lactiques au cours d'une incubation reproduisant le diagramme thermique de la fabrication dans laquelle elle intervient au lieu d'une incubation à la température optimale de croissance a été démontré par Chamba et Prost (Novel, 1993).

C'est dans ce contexte que nous avons établi les profils de pH des souches isolées à 30°C et à 21°C car cette dernière est très utilisée pour la préparation des levains mésophiles dans les cuves de fabrication afin de maintenir les bactéries lactiques dans un pH optimal à leur activité et d'éviter leur dommage cellulaire et de reprendre leur croissance.

L'examen des courbes représentées par les figures 31 et 32 montre en général, que le pouvoir acidifiant est plus important à 30 °C qu'à 21 °C.

Les écarts dans les valeurs du pH deviennent plus importants après les deux heures de cultures, correspondant à la fin de la phase de latence. Après 24 heures d'incubation, les niveaux d'acidité sont les plus élevés pour s'estomper par la suite au delà des 48 heures.

Les résultats illustrés dans les figures 31 et 32 pour les souches *Lc. L1*, *Lc. L9*, *Lc. C1*, *Lc. L** et *Lc. D2* montrent que l'allure générale de la cinétique d'acidification pour les températures de 30 °C et de 21 °C est similaire pour les souches locales ainsi que pour les souches industrielles.

D'autre part, les profils des pH représentant chaque groupe de souches mettent en évidence la sensibilité plus au moins grande de ces souches par rapport à la température d'incubation.

Les cellules cultivées à 30°C atteignent plus rapidement des pH acides et séjournent donc plus longtemps dans cet environnement acide ; ceci entraînerait une baisse de leur viabilité. C'est ainsi que Lucas et Reyrolle, (1989). Ces auteurs ont constaté que les souches de *Lactococcus lactis lactis* semblent peu atteintes alors que *Lactococcus lactis diacetylactis* et surtout *cremoris* sont sensibles à ce maintien à des acidités élevées et leur viabilités se voit donc diminuée.

Selon Kim et al, (1999), dans des conditions acides, le niveau sous létal et létal est respectivement de pH 4,5 et 2,5 pour *Lc. lactis* et de pH 5 et 3 pour *Lc. cremoris*. Les différents mécanismes de réponse des bactéries lactiques au stress acide ne sont pas bien connus. Il semble qu'au moins deux systèmes distincts interviennent dans la réponse de *Lc. lactis* aux conditions acides en fonction de la phase de croissance. Selon Harke et al, (1996), durant la phase exponentielle, la réponse est activée par la présence des protons H⁺ mais est indépendante du pH externe durant la phase stationnaire. Ces deux systèmes n'ont pas été retrouvés chez *Lc. cremoris* (Kim et al., 1999).

Des études récentes ont mis en évidence le rôle clé de l'expression de plusieurs gènes intervenant dans les voies métaboliques et pouvant expliquer les différences de sensibilités au stress acide entre les deux sous espèces de *Lc. Lactis* (Even et al., 2002). C'est le cas notamment pour l'expression du gène *deoB*, codant pour une phosphopentomutase impliqué dans le métabolisme des nucléotides à bases puriques. Ces dernières régulent, en partie, le niveau d'induction des réponses à différents stress (Rallu et al., 2000).

Les souches de *lactococcus lactis subsp diacetylactis* possèdent un mécanisme supplémentaire relié au métabolisme du citrate, leur permettant de s'adapter aux conditions acides. Magni et al, (1999), expliquent le rôle du cit P dans la résistance de cette sous espèce aux conditions acides (voir annexe)

Il en ressort qu'afin d'assurer un équilibre constant entre les différentes espèces d'un levain multiple, il faut particulièrement veiller au respect des conditions de fabrication des levains et contrôler le plus possible les modifications éventuelles des flores.

Au vu de ces résultats nous pouvons confirmer que nos souches isolées localement sont intéressantes sur le plan technologique. En effet, leur comportement vis à vis de l'acidité aux températures particulièrement utilisées en industrie laitière (21 et 30 °C) est identique à celui des souches industrielles.

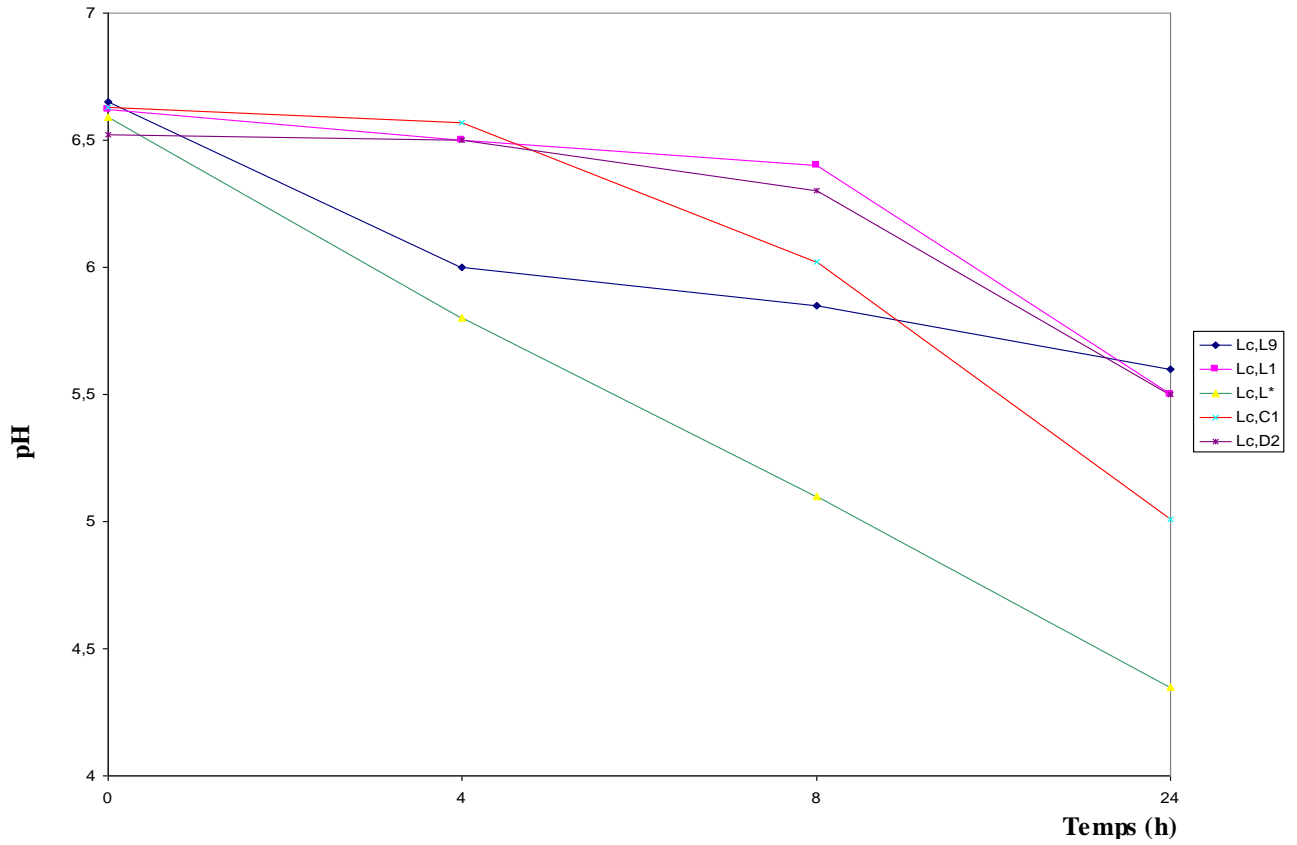


Figure 31 : Evolution du pH, en fonction du temps, des souches mésophiles cultivées à 21 °C.

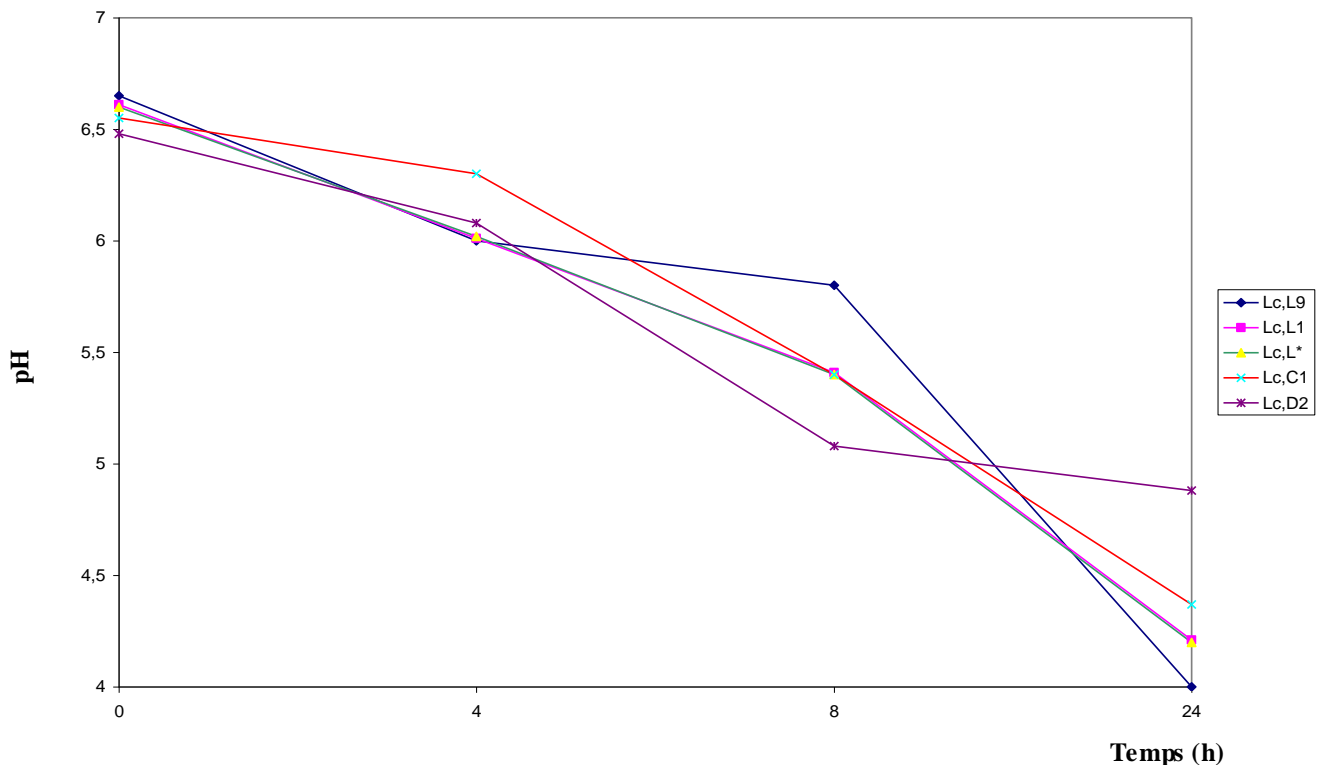


Figure 32 : Evolution du pH, en fonction du temps, des souches mésophiles cultivées à 30 °C.

Tableau 32: Caractéristiques d'acidité des souches de lactocoques pures cultivées à 30 °C.

SoucheS	Mesures des pH après				4 h		8 h		24 h		Vm	pHm	Tm	pHf
	0 h	4 h	8 h	24 h	Δ pH	V	Δ pH	V	Δ pH	V				
Lc.L1 1	6,61	6,01	5,41	4,21	0,6	2,50	0,6	1,25	1,2	0,83	2,5	6,01	4	4,21
Lc.L2 2	6,6	6,1	5,92	4,3	0,5	2,08	0,18	0,37	1,62	1,12	2,08	6,1	4	4,3
Lc.L3 3	6,6	6,51	5,2	4,35	0,09	0,37	1,31	2,73	0,85	0,59	2,73	5,2	8	4,35
Lc.L4 4	6,62	6,2	5,46	4,24	0,42	1,75	0,74	1,54	1,22	0,84	1,75	6,2	4	4,24
Lc.L5 5	6,56	6,09	4,75	4,42	0,47	1,95	1,84	3,83	0,33	0,22	3,83	4,75	8	4,42
Lc.L6 6	6,54	6,2	5,15	4,46	0,34	1,41	1,05	2,18	0,69	0,47	2,18	5,15	8	4,46
Lc.L7 7	6,63	5,98	4,7	4,15	0,65	2,70	1,28	2,66	0,55	0,38	2,7	5,98	4	4,15
Lc.L8 8	6,55	6,19	5,12	4,45	0,36	1,50	1,07	2,23	0,67	0,46	2,23	5,12	8	4,45
Lc.L9 9	6,65	6	5,8	4	0,15	2,70	0,70	1,45	0,80	0,55	2,7	6	4	4
Lc.L10 10	6,54	6,2	5,15	4,46	0,34	1,41	1,05	2,18	0,69	0,47	2,18	5,15	8	4,46
Lc.L11 11	6,4	5,5	4,75	4,25	0,9	3,75	0,75	1,56	0,5	0,34	3,75	5,5	4	4,25
Lc.L12 12	6,6	5,98	5	4,21	0,62	2,58	0,98	2,04	0,79	0,54	2,58	5,98	4	4,21
Lc.L13 13	6,3	5,3	4,5	4,1	1,0	4,16	0,8	1,66	0,4	0,27	4,16	5,3	4	4,1
Lc.L* 14	6,6	6,02	5,4	4,2	0,58	2,41	1,2	2,5	2,4	1,66	2,5	5,4	8	4,2
Lc.C1 15	6,55	6,3	5,4	4,37	0,25	1,04	0,9	1,87	1,03	0,71	1,87	5,4	8	4,37
Lc.C2 16	6,56	6,2	5,4	4,32	0,36	1,50	0,80	1,66	1,08	0,75	1,66	5,4	8	4,32
Lc.C3 17	6,5	6,23	5,64	4,35	0,27	1,12	0,59	1,23	1,29	0,89	1,23	5,64	8	4,35
Lc.C* 18	6,64	6,4	5,8	4,38	0,24	1,00	0,84	1,75	2,26	1,57	1,75	5,8	8	4,38
Lc.D1 19	6,58	6,5	6,41	5,15	0,08	0,33	0,09	0,18	1,26	0,87	0,87	5,15	24	5,15
Lc.D2 20	6,48	6,08	5,08	4,88	0,40	1,66	1,00	2,08	0,20	0,13	2,08	5,08	8	4,88
Lc.D3 21	6,58	6,51	6,18	5,1	0,07	0,29	0,33	0,68	1,08	0,75	0,75	5,1	24	5,1
Lc.D4 22	6,57	6,49	6,37	5,2	0,08	0,33	0,12	0,25	1,17	0,81	0,812	5,2	24	5,2
Lc.L14 23	6,6	5,8	5,1	4,5	0,80	3,33	0,70	1,45	0,60	0,41	3,33	5,8	4	4,5

V : Vitesse d'acidification (pH/T).

Vm : Vitesse maximale d'acidification

pHm : pH maximum

Tm : Temps ou intervient Vm

pHf : pH final

Lc. L : *Lactococcus lactis subsp lactis*

Lc. C : *Lactococcus lactis subsp Cremoris*

Lc. D : *Lactococcus Lactis subsp diacetylactis*

Lc. L*ou C* : Ferments industriels

II.3.6.1/ Analyse statistique :

L'analyse statistique de nos données est basée sur l'ACP, qui a pour but la qualification de nos souches mésophiles étudiées.

Le classement des souches s'est fait en tenant compte de tous les caractères étudiés. La mesure du pH remplace de plus en plus celle de l'acidité titrable. En effet, elle est facile à exécuter et ne s'affecte que par un très faible coefficient de variation.

Dans le cadre de notre travail, quatre différents descripteurs caractéristiques de l'activité acidifiante de nos souches ont été calculés dans le but de caractériser le pouvoir acidifiant nécessaire à la comparaison des performances des souches étudiées (tableau 32) (Pique et *al.*, 1992 ; Zarata et Basso, 1992).

Les descripteurs calculés sont représentés par :

- ✓ **V_m** : Vitesse maximale d'acidification
- ✓ **T_m** : Temps où intervient V_m
- ✓ **pH_m** : pH maximum
- ✓ **pH_f** : pH final

Cette approche généralise la description du comportement d'acidification d'un large nombre de souches par l'application des techniques basées sur l'analyse statistique multi-variée. De ce fait un quatrième descripteur est ajouté aux quatre précédant ; il s'agit de la vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance μ .

Une analyse exploratrice des données obtenues est appliquée, elle est basée sur différentes représentations graphiques qui tiennent compte des paramètres estimés dans le tableau 32. Les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans les tableaux qui suivent.

➤ **Etude des variables :**

Nous avons réalisé une analyse en composantes principales où nous avons introduit 05 variables.

A - Corrélation linéaire :

Avant d'entamer l'analyse des résultats par utilisation de l'ACP, il est utile d'avoir une idée sur les liaisons existantes entre les variables prises deux à deux (Tableau 33).

Tableau 33: Corrélations entre les variables

Variables	Vm	pHm	Tm	pHf	μ
Vm	1				
pHm	0,04	1			
Tm	-0,69	-0,52	1		
pHf	-0,63	-0,54	0,90	1	
μ	0,35	0,46	-0,54	-0,67	1

B- Valeurs propres :

Une valeur propre ou variance exprime le degré de dispersion des variables par rapport à leur point d'origine sur l'axe des composantes principales. La variance expliquée par chaque axe est exprimée en pourcentage par rapport à la variance totale (tableau 34).

Tableau 34: Valeurs propres et pourcentages respectifs des axes

	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4	Axe 5
Valeurs propres	3,2243	0,9975	0,5145	0,1871	0,0766
Pourcentage	64,49	19,95	10,29	3,74	1,53
Pourcentage cumulé	64,49	84,44	94,73	98,47	100,00

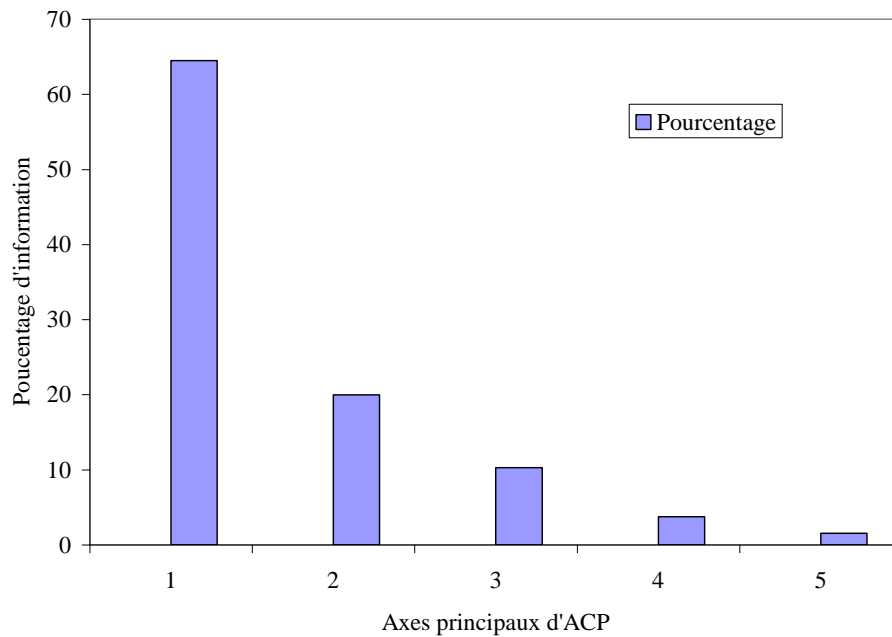


Figure 33: Histogramme de variabilité en fonction des facteurs.

Les axes 1 et 2 contribuent à représenter nos variables à 64,49 et 19,95 % respectivement. Ce pourcentage est beaucoup plus faible pour les axes 3 ,4 et 5 (10,29, 3,74 et 1,53 respectivement).

Les différentes composantes principales étant non corrélées entre elles. La part de l'information expliquée par deux axes du même plan est égale à une simple addition des parts des variances expliquées par chacun d'eux. Ainsi, le plan formé par les deux premiers axes explique 84,44 %, de la variance totale. L'information expliquée par les trois premiers axes est de 94,73 %, à partir du quatrième axe, l'information expliquée devient assez faible pour être prise en compte.

Les pourcentages de variation sont assez élevés pour les deux premiers axes avec un pourcentage cumulé de 84,44 %. Nous allons donc nous limiter à ces deux axes, où nos variables sont mieux représentées (figure 33), pour nos interprétations.

C- Etude des variables :

La contribution de chaque variable dans la formation d'une composante principale est donnée par le coefficient de corrélation entre la variable et l'axe considéré ; autant que ce coefficient est important autant que cette variable contribue dans la formation de l'axe.

L'ACP, par son traitement multiparamétrique, permet de mettre en évidence les interactions entre les variables étudiées. En effet, la projection de toutes les variables dans l'espace factoriel décrit par l'ACP est exprimée par la coordonnée de la variable sur l'axe correspondant. Dans le cas d'une ACP normée, les coordonnées des variables sur les axes sont égales aux coefficients de corrélation de ces variables sur les axes.

La description de la relation entre les variables est faite selon leurs directions dans le plan formé par deux composantes principales. Cette relation nous permet de voir comment les variables sont structurées.

La part de variation d'une variable dans un plan peut être également expliquée en faisant la somme des r^2 (cosinus carrés d'angles) ou coefficient de corrélation au carré, correspondant aux axes qui le composent (tableau 35). Alors il apparaît que toutes les variables, sont bien représentées dans le plan principal.

Tableau 35: Corrélations des variables avec les axes principaux.

	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Axe 4		Axe 5	
Vm	-0,70	0,49	-0,66	0,43	0,05	0,0025	-0,27	0,73	-0,03	
pHm	-0,62	0,38	0,70	0,49	0,29	0,95	-0,20	0,04	-0,02	0,0004
Tm	0,93	0,86	0,12	0,0144	-0,23	0,53	-0,15	0,0225	-0,19	0,036
pHf	0,96	0,92	0,03	0,0009	-0,03	0,0009	-0,22	0,0484	0,19	0,036
μ	-0,75	0,56	0,23	0,53	-0,61	0,37	-0,05	0,0025	0,05	0,0025

1^{ère} colonne : Corrélations entre les variables et les axes principaux

2^{ème} colonne : Corrélations au carré.

Le cercle de corrélation (Figure 34) établi entre les deux premières composantes principales ne montre pas d'oppositions claires entre les groupes de variables et qu'elles sont proche de la périphérie du cercle, cela confirme qu'elles sont bien représentées (De La Garde, 1983).

Les coefficients de corrélations entre les axes principaux et les variables, montre que les descripteurs Tm et pHf sont fortement corrélés à l'axe 1 avec des corrélations au carré 0,86 et 0,92 chacun. Les variables Vm, pHm et μ ayant des corrélations au carré 0,43, 0,49 et 0,53 respectivement sont beaucoup mieux corrélés à l'axe 2.

Sur la base de ces données l'axe 1 sera représenté par les variables Tm et pHf, et l'axe 2 par les variables Vm, pHf et μ .

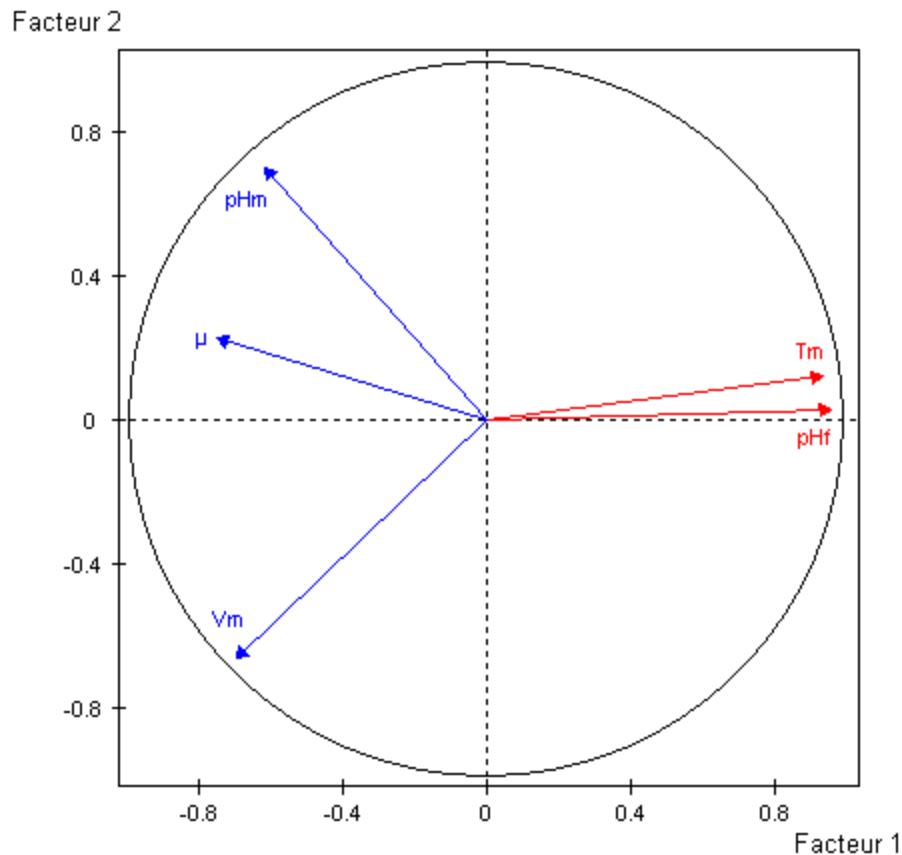


Figure 34 : Cercle de corrélation des variables entre les deux premiers axes.

C- Etude des individus :

Donc, nous avons en définitif recherché une représentation des données facilitant la comparaison rapide des souches par l'ensemble de leurs caractères et leur regroupements. Par comportement similaire, le remplacement d'une souche par une autre ayant un caractère analogue devient facile et utile à la suite d'une attaque phagique.

La projection des 23 individus sur le plan et en se rapportant aux distances de rapprochement entre ceux-ci. Grâce à cette notion de distance on essaye de repérer d'éventuels groupements.

La représentation graphique de nos souches a été faite sur la base des résultats de l'analyse statistique (Figure 35).

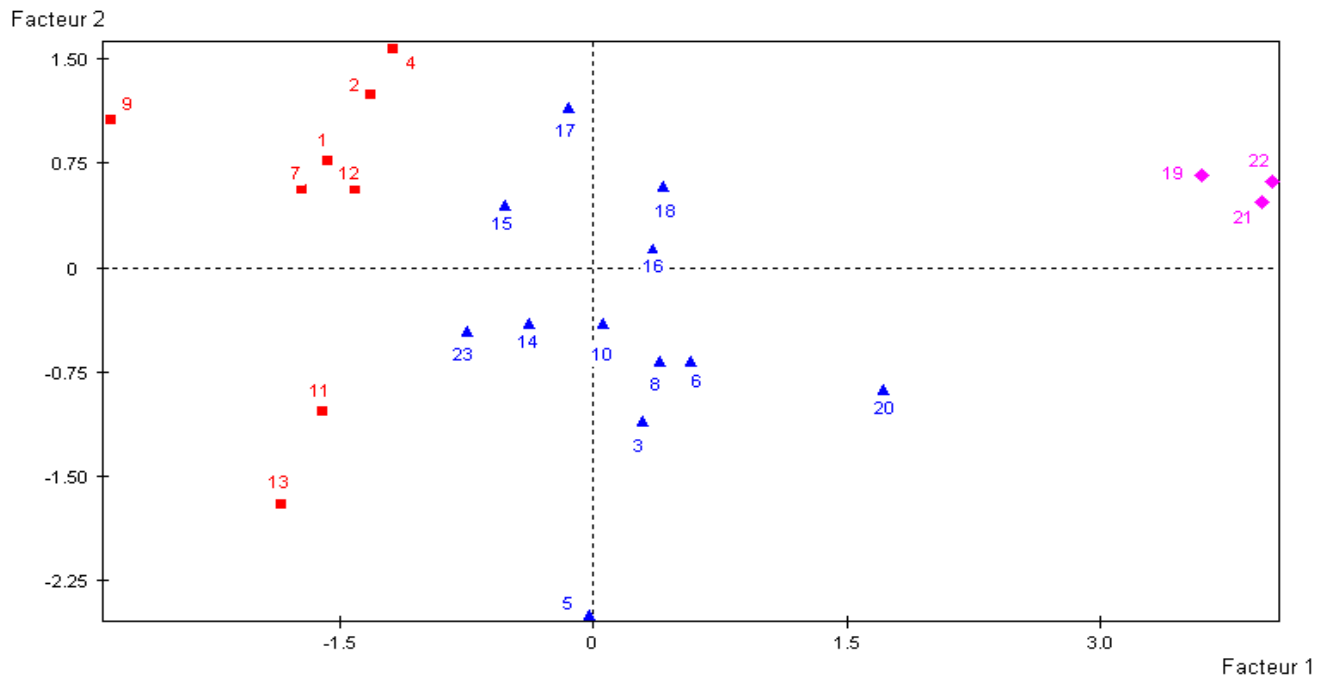


Figure 35 : Projection des individus sur le plan formé par les deux axes

(Données expérimentales)

Sur le plan défini par les axes 1 et 2, on peut distinguer clairement 03 groupes de souches :

➤ **Groupe 1** : Comporte 08 souches (1, 2, 4, 7, 9, 11, 12 et 13).

Ce groupe représente 34,78 % de l'ensemble des souches, caractérisées par une vitesse d'acidification moyenne de 2,34 supérieures à celle enregistrée par les souches de référence. Ce groupe contient toutes les souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* ayant une vitesse d'acidification élevée isolées localement à partir des laits de vache et de chèvre non soumis à un traitement d'antibiotiques et issu d'une seule traite (traite matinale).

Les laits sont prélevés dans différentes régions du périmètre du moyen Cheliff durant les trois saisons (hivers, printemps et été) à partir de races locales et importées sont soumis à un même régime alimentaire (pâturage naturel). Les éleveurs pratiquent une traite mécanique.

➤ **Groupe 2** : Ce groupe comporte 12 souches (3, 5, 6, 8, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 20 et 23) représentant toutes les souches ayant des vitesses d'acidification moyenne $V_m = 2,20$ inférieure à celle du premier groupe. Ces souches représentent 52,18 % de l'ensemble des souches étudiées, caractérisées par un pH final faible atteint en un temps maximum T_m relativement supérieur à celui du premier groupe ($T_m = 8$).

Les souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* proviennent toutes de lait de vache de races locale exception faite pour *Lactococcus lactis subsp cremoris* qui provient de lait de vache et de brebis aussi de races locales. Tandis que la souche *Lactococcus lactis diactylactis* provient de lait de chèvre. La traite des laits de provenance de ses souches est mécanique. Les races animales sont soumises à des régimes alimentaires différents. L'individu 5 se comporte différemment par rapport aux autres individus, la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* provient de lait de vache de race importée.

- **Groupe 3** : Ce groupe comporte 3 souches (19, 21 et 22) ; toutes appartenant à la sous espèce *Lactococcus lacis diacetylactis*. Représentant 13,04 % de l'ensemble des souches isolées, caractérisées par une vitesse d'acidification moyenne très faible par rapport à celle des deux premiers groupes ; $V_m = 0,810$ et des T_m très lents ($T_m = 24$ h). Ces souches proviennent toutes des lait de vache et de brebis locales. La traite est manuelle.

La répartition des souches dans le périmètre du moyen Cheliff est donnée par les figures : 36, 37 et 38.

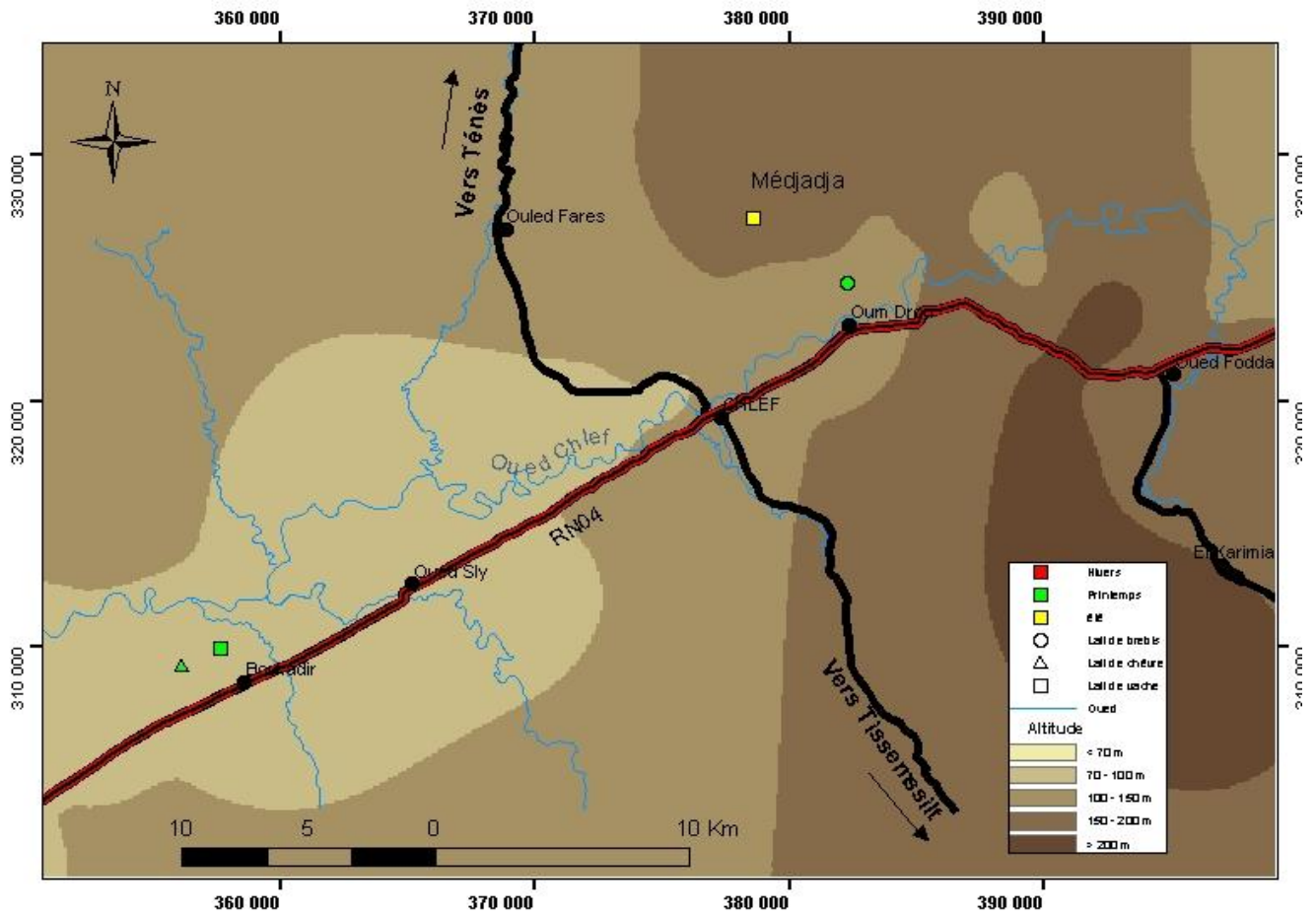


Figure 36 : Répartition de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons

D'après la figure 36, on peut constater que *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* peut être isolée à partir de lait de vache dans la région de Médjadja ; là où l'élevage bovin est intense, l'alimentation est disponible ainsi qu'il y a respect des pratiques d'élevages dans l'ensemble.

Par ailleurs, cette souche peut être isolée durant la saison printanière à partir de lait de vache et de chèvre de Boukadir et partir de lait de brebis d'Oum Drou.

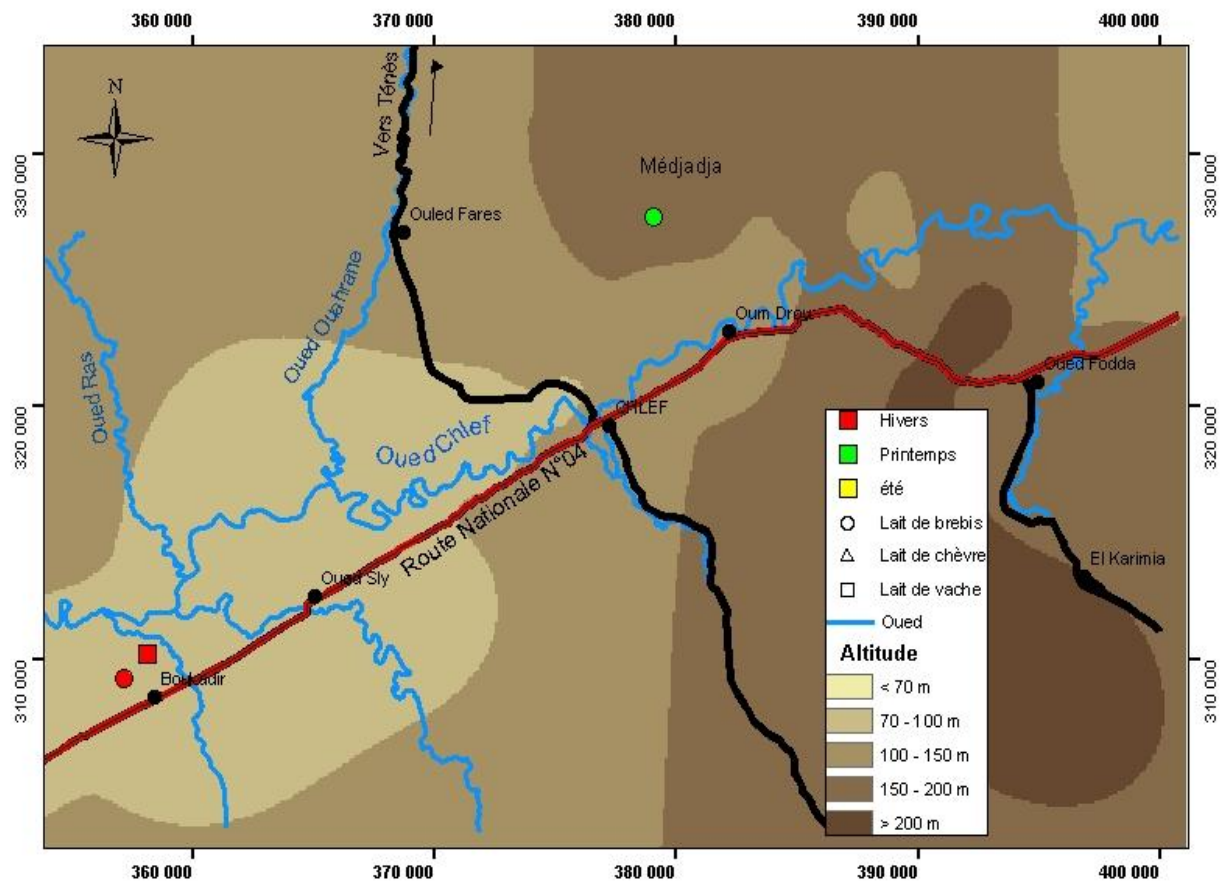


Figure 37 : Répartition de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* dans le périmètre du moyen Chelif en fonction des saisons

Lactococcus lactis subsp. cremoris peut être isolée à partir de lait de brebis de Médjadja et de Boukadour durant la saison hivernale de laits de vache et de brebis.

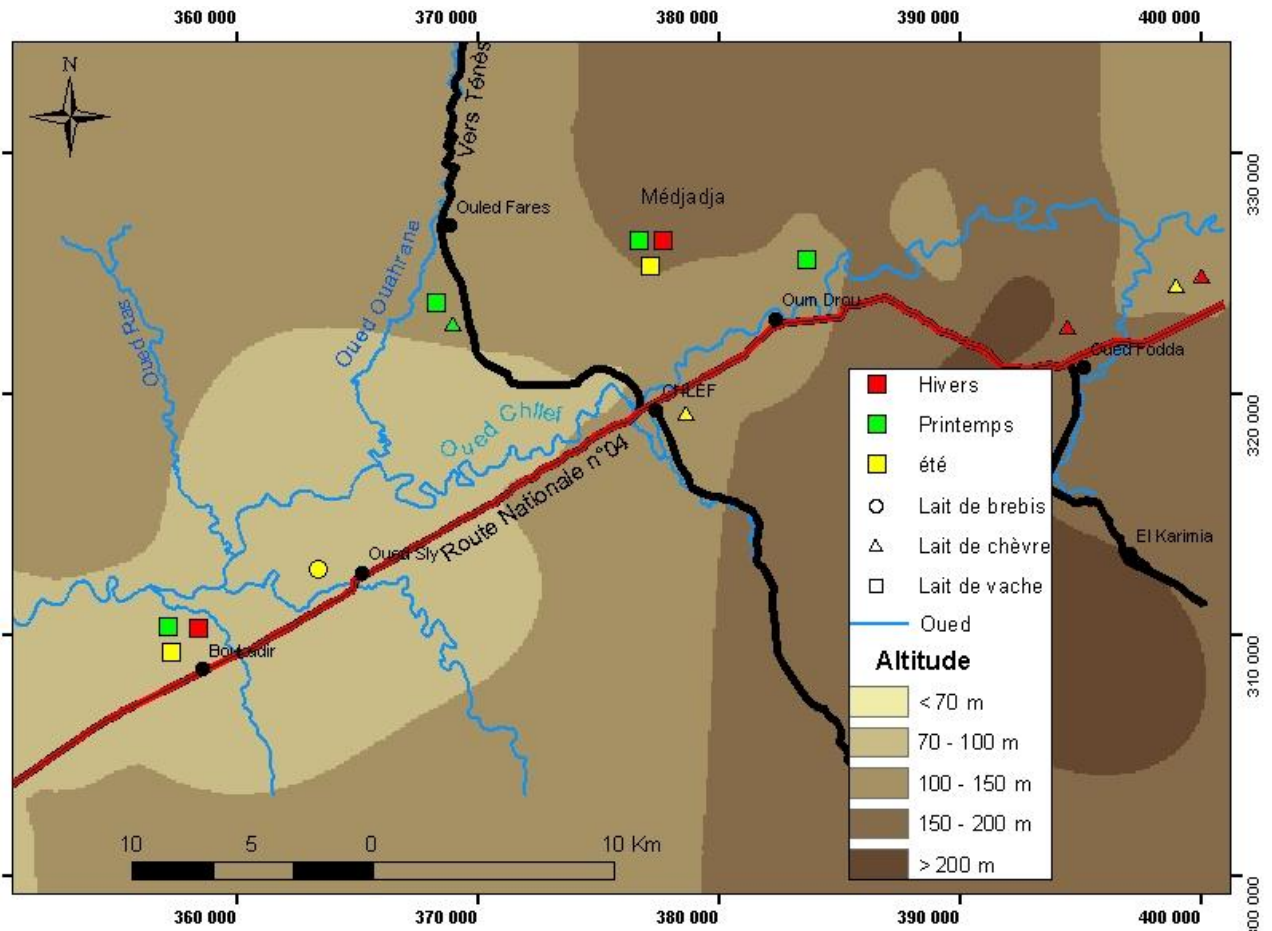


Figure 38 : Répartition de *Lactococcus lactis subsp. lactis* dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons

Lactococcus lactis subsp. lactis peut être isolée de lait de vache durant les trois saisons de la région de Medjadja et Boukadir. Cette souche peut également être isolée à partir de lait de brebis durant l'été de Oued Sly et de Chlef centre à partir de lait de chèvre durant la même saison et de Oued Fodda et Ouled ABBES durant l'hivers et l'été toujours à partir de lait de chèvre.

Nous pouvons conclure que l'intensité d'élevage, la race, l'origine animale, le climat (qui influe sur la diversité du couvert végétal, le niveau des eaux dans les nappes ainsi que sur la composition minérale de ses eaux) et les pratiques d'élevage (traite manuelle ou mécanique, régime alimentaires, pâturage naturel) influent considérablement sur la répartition des souches isolées. La connaissance de l'influence de ces facteurs peut diriger les axes de recherche (l'isolement des souches) ainsi que l'implantation des unités productrices du lait et ses dérivés.

CONCLUSION GENERALE

Le groupe de levains mésophiles, auxquels les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait et former des arômes. Outre son implication directe dans la constitution de la matrice fromagère et dans les caractéristiques rhéologiques et texturales des produits finis, l'acidification du lait présente également, via son action inhibitrice vis-à-vis de la croissance bactérienne, un double intérêt sanitaire (inhibition de pathogènes) et organoleptiques (inhibition des bactéries nuisibles aux qualités du produit).

Dans le but d'obtenir des lactocoques à haut potentiel technologique exploitable, la démarche exige un isolement, effectué dans notre cas, à partir des lait de vache, de chèvre et de brebis dans le périmètre du moyen Cheliff durant les trois saisons : hivers, printemps et été, qui a aboutit à la collection de 42 souches. Après identification, seuls 21 souches ce sont révélées des lactocoques dont : 14 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis*, 3 souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* et 4 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*.

Nous avons également utilisés des souches industrielles qui nous en servi comme référence.

La diversité génomique de *Lactococcus lactis subsp lactis* a permis d'associer certaines souches à certains élevages. Par ailleurs, on a constaté durant la réalisation de ce travail une dominance :

- de *Lactococcus lactis subsp lactis* dans les laits de vache et de chèvre ;
- de *Lactococcus lactis subsp cremoris* dans le lait de brebis ;
- de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* dans le lait de brebis.

En effet, Chaque type de lait constitue une niche écologique abritant une flore microbienne qui lui est propre qui est donc l'un des éléments unissant le terroir à la typicité du produit.

L'étude des caractéristiques technologiques révèle que ces souches présentent un potentiel technologique intéressant. En effet,

- L'ensemble des souches ne produit pas d'amines biogènes
- Leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques est élevée à l'exception des souches *L. D1* et *Lc. L11* qui sont résistantes à l'érythromycine et à l'ampicilline respectivement et *Lc. L1* qui également résistante à l'ampicilline.
- En 24 h d'activité nos souches peuvent atteindre 87°D à 89 °D ; ce sont principalement les souches *Lc. L13* et *Lc. L 9* avec des taux de croissance considérables 0,38 à 0,42 h⁻¹ respectivement.

D'une part, nous avons pu mettre en évidence non seulement la diversité des souches mais aussi leur similarité en utilisant une méthode d'analyse relativement peu coûteuse et précise qui est l'ACP. L'analyse en composantes principales a permis une répartition des souches en 03 groupes distincts :

Le premier groupe renferme les souches présentant les vitesses d'acidification les plus élevées alors que le troisième groupe est celui des souches les plus faiblement acidifiantes avec des temps plus ou moins longs (24 h). Le groupe intermédiaire présente des résultats d'acidification moyens.

D'autre part, les profils des pH représentant chaque groupe de souches mettent en évidence la sensibilité plus ou moins grande de ces souches par rapport à la température d'incubation. Ainsi le séjour des cellules bactériennes à 30 °C affecte à un degré différent les souches de *Lactococcus lactis diacetylactis* et *Lactococcus lactis cremoris* mais semble sans effet sur *Lactococcus lactis subsp lactis*.

La répartition des souches révèle une variation de distribution temporelle et géographique due à une multitude de facteurs. Hormis ces derniers, le type d'alimentation, les microclimats des régions de prélèvements, les pratiques d'élevage,...

Nous espérons dans les études qui viennent une caractérisation complète des laits de prélèvements (caractérisation physicochimiques, microbiologiques et détermination des fractions protéiques), une enquête d'élevage qui nous permettra de connaître les causes de répartitions des souches en fonction des saisons et les endroits de prélèvements et enfin en augmentant le nombre d'échantillonnage pour avoir des résultats plus significatifs et concluants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACCOLAS J. P., (1980). Les levains lactiques thermophiles, propriétés et comportement en technologie laitière. Le lait 50 :375-393 p.
- ALAIS C., (1984). Sciences du lait : principes des techniques laitières, 4^{ème} Edition, Paris, 814 p.
- ANAT, (1995) : Rapport de schéma d'aménagement phase I, agence nationale d'aménagement du territoire.
- ANTOINE J. M., ADAM F., FAZEL A., HARTEL Y. D., (1993). Bactéries lactiques en alimentation humaine, bactéries lactiques 2. Edition Lorica.
- ARNH, (2001) : Bulletin de l'agence nationale des ressources hydriques.
- AUBERT C., (1998). Caractérisation microbiologique du fromage type VENACO : un fromage de corse à pâte molle. Rapport de stage de 2^{ème} année d'Ecole d'Ingénieur.
- BASSIT N., COCHET N., LEBEAUT J. M., (1993). Influence of water activity on *Streptococcus diacetylactis* metabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 399-401.
- BENECH R., (2002). Impact de l'ajout de nisine Z sur les caractéristiques microbiologiques, rhéologique et organoleptiques d'un fromage de type Cheddar : Approche immunologique et microscopique. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- BERGERE J. L., (1984). Traitements du lait de fromagerie et substances auxiliaires de fabrication ajoutée au lait, le fromage. Ed. ECKA .
- BOUDIER J. F., (1985). Les biocatalyseurs. In : Laits et produits laitiers. Ed. EcK. PP 45–74.
- BOURGEOIS C. M., MESCLE J. F et ZOUCCA., (1996). Microbiologie Alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris.
- BOYAVAL P., DEBORDE C., CORRE C., BLANCO C. et BEGUE E., (1999). Le lait, 79 p.
- BRADLY R. L., ANOLD E., BARBANO D. M., (1992). Chemical and physical methods. In. Marshall Ed. Standard Methods for the Examinations of Dairy Products. pp. 433-531.
- BRULE G, LENOIR J. et REMEUF F., (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. Le Fromage, Partie1, Edition ECK., GILLIS J. C. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris.

BUCHNAN R. E et GIBBSONS N. E., (1974). Bergey's Manuel of determination bacteriology. 8^{ème} Edition. 15-26.

CAMUS A., LANIÉSSE P. et BURDIN J, (1951). La formation du diacétyle dans les levains de beurrerie. Le lait N° 31. 225 – 233.

CHAMBA J- F. et PROST, (1989). Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication des fromages à pâtes cuites. Le lait. 69 : 417- 431.

CHAMPAGNE C. P., LANGE M., (1992). Caractéristiques et emploi de cultures lactiques en industries laitières.

CHAMPAGNE C. P., (1998). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Edition Maloine, Paris.

CHAMPAGNE C. P., AUDET P., GELINAS P., LANGE M. et MOINNEAU S., (1998). Production des ferments lactiques dans l'industrie laitière. Edisem, La fondation des gouverneurs ; Québec.

CHAMPAGNE C P., MOINNEAU S., LANGE M., GELINAS P. et AUDET P., (2000). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed. Fondation des Gouverneurs, 201 p.

CHRISTENSEN J. E., DUDLEY E.G., PEDERSON J. A., STEELE J. L., (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 76 : 217 – 246.

CHOISY C., (1987). Les levains lactiques et les bactéries lactiques. In: Le fromage. Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris, 108 – 115.

COAIGN-BOUSQUET M., LINDLEY N. D. (1995). Pyruvate over flow and carbon flux within the central metabolic pathway of corynebacterium glutanium during growth ou lactate. Enz. Microbiol. Technol. 17 : 260 – 267.

COGAN T. M., (1980). Les levains lactiques mésophiles. Le lait, 60 (598) : 397-425.

COGAN T.M., (1981). Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait*, 60 : 397 – 425.

COLLINS M. D. et GIBBSON G. R., (1999). Probiotics, Prebiotics, and symbiotics approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Ann. J. Clin. Nutr., 69 : 125-275.

DAVIAU C., FAMELART M.H., PIERRE A., GOUDEDRANCHE H. et MAUBOIS J.L., (2000). Rennet coagulation of skin milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. Lait, 80 (4) : 397 – 415.

- DEBRY G., (2001). Lait, nutrition et santé. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris, 544 p.
- DE LAGARDE J., (1983). Introduction à l'analyse des données. Ed. Dunod : Paris. 158 pp.
- DELLAGLIO F., (1988). Starters for fermented milks, section 3: thermophiles starters in « fermented milks, sciences and technology ». Bulletin Fil, 227 : 27-33.
- DELLAGLIO F., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed. Loriga Lavoisier, Paris.
- DEROISSART H. B., (1986). Les bactéries lactiques : lait et produits laitiers vaches, brebis, chèvres. Ed. Arria.
- DEROISSART H.B., et LUQUET M., (1994). «Bactéries lactiques». Vol I. Ed. Loriga. 605 p.
- DERVIN C. H., (1992). Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle. Collection STA-ITCF, 93 p.
- DETMERS F. J., LARFENMEIJER F. C., ABELE R. et POOLMAN B, (2000). Combinatorial peptide librature reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor. OppA of *Lactococcus lactis*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 97 : 12487 – 12492.
- DEVIS C., FREY L., HUBERT J. C., DEROISSART H., (1994). Métabolismes d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga. Vol I. PP169-207.
- DESMAZEAUD M., (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Rev. Le lait, 63. : 267- 316.
- DESMAZEAUD M. J., (1994). Le lait milieu de culture. Dans : H. DEROISSART et F. M. DESMAZEAUD M., (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Cahier agricultures, 5 : 331-343.
- DIDAY E., Le MAIRE j., POUGET J. et TESTU., (1982). Eléments d'analyse de données. Ed. Bordas, 463 p.
- DOLEYRES Y., (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- DUPUY C. P., (2004). Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.

EVEN S., LINDLEY U. D., LOUBIÈRE P., COCAIGN-BOUSQUET, (2002). Dynamic response of catabolic pathway of autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation of metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.* 45: 1143 – 1152.

EZZAT N., EL SODA M., BOILLANNE C., ZEVACO C. et BLANCHARD P., (1985). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*.40: 140-143.

EZZAT N., ZEVACO C., EL SODA M. et GRIPON G., C., (1987). Partial purification and characterization of cell wall associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*.42: 95-97.

FAO, (1990). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/ Alimentation et nutrition, 23 p.

FAO, (2002). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre 5 : laits fermentés. Collection FAO/ Alimentation et nutrition, 28 p.

GAUDIN., (1981). Mathématiques et Informatique, analyse en composante principales, INAPG., 43p.

GAUTIER M., ROUALT a., HERVE C., Sommer P., LERET V., Jan G., FRASLIN J M., PECOT F. et COSTE A., (1999). Le lait, 79 : 93 – 104.

GIRRAFA G. et BERGERE J. L., (1987). Nature du caractère épaississant de certaines souches de *Streptococcus thermophilus* in biochemistry of cheese and fermented milk. Ed. Elsevier, London. pp 35-36.

GUEDON E., RENAULT P., EHRLICH D., DELORME C., (2001). Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J Bacteriol* 183 : 3614 – 3622.

GUIRAUD J. P., (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris.

GONZALEZ D. L., CUESTA P. et RODRIGUEZ A., (1998). Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *The Society for Applied Microbiology*. pp 272-274.

HAMON .Y, (1964). Les bactériocines. *Ann. Ist. Pasteur.* 107 (supp 5): 18.

HARKE A., BOUCHE C., GIARD C., BENACHOUR A., BOUTIBOONES P et AUFRAY Y., (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis cremoris subsp lactis*. *Cur. Microbiol.* 33: 194 – 199.

HARTLEY., DUDONG C., DAVID P. et FAZEL., (1989). Symbiosis of yoghurt microorganisms. Les laits fermentés, 139-145.

HERMIER J., LEVOIR R J. et WEBER F., (1992). Les groupes microbiens d'intérêt laitiers. Ed Cepil. PP 42-59.

JAUBERT G., (1997). Flavour of goat farm bulk milk. Cha opt Medite, 93 p.

JENSEN P. R., HAMMER K, (1993). Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4363 – 4366.

JUILLARD V., SPINLER H. E., DESMAZEAUD M. J. et BOQUIEN C. Y., (1987). Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait, 67:149 p.

JUILLARD V., LAAN H., KUNJI E., JERONEMUS-STRATINGH C. M., BRIUNS A., KONNINGS W., (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -caseine into more than one hundred different oligopeptides. J Bacteriol 177: 3472 – 3478.

JOOSTEN H.M. I J., NORTHOLT M. D., (1989). Detection, growth and amine producing-capacity of *Lactobacilli* in cheese. Applied and Environmental Microbiology, 55, 2356-2359.

KIM. W. S., DUNN N. W., (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis subsp lactis* and *subsp cremoris* strains by their adaptative reponse to stress. FEMS. Microbio. Lett.171: 57 – 65.

KING N., (1948). Modification of the voges-proskauer test for rapid colometric determination of acetylmethyl carbinol plus diacetyl in butter cultures. Dairy industries, 13,860-866.

KONNINGS, (1994). Mécanisme de transport des nutriments dans les bactéries lactiques in « Bactéries lactiques ». Ed. Loriga Lavoisier. PP 198-218.

KONNINGS W. N., (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 70: 187 – 221.

KORHONEN H., PIHLANTO A., (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. Curr pharm Des 9 : 1297 – 1308.

LACHANCE M, (2000) : Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lc. lactis* MJC15. Thèse de grade de maître des sciences (M.sc).

LARPENT J. P., (1987). Microorganismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages. Leur rôle sur les propriétés organoleptiques. I.A.A. Juin, 535-546.

LAW B. A., (1978). Peptide utilization by group N Streptococci. J.Gen. Microbiol., 105: 113 – 118.

LAW B. A., (1984). Flavour development in cheese. In: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Ed. Elsevier Applied Science Publ., London. PP 186- 208

LEROY F., DEVUYST L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 15:67 – 78.

LEVEAU J. Y., BOUIX M., DEROISSART H., (1991). La flore lactique. In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol. 2. Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 77 – 115.

LEVEAU J. Y. et BOUIX M., (1993). Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. TEC et DOC- Lavoisier.

Le GRAET Y. et BRULE G., (1993). Effect of pH and ionic strength on distribution of mineral salts in milk. Le lait, 60 p.

LOONES A., (1994). Les laits par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Ed Larica, 2 : 137-145.

LUCAS S., RAYROLLE J., (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles, équilibre de la flore au cours de la première étape de fabrication de levains. Le lait. 69 : 121 – 130.

LUQUET Eds. Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques, Vol 2, pp 25-36.

LUQUET F. M., (1986). Bactéries lactiques. In : lait et produits laitiers (vache, chèvre, brebis). Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP 77-112.

MAGNI C., DE MANDOZA D., KONINGS W. N., LOLKMAN J. S., (1999). Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus cremoris*: resistance against lactate toxicity at low pH. J. Bacteriol. 181 : 1451 – 1457.

MICHEL V., HAUWRY A. et CHAMBA J-F. (2001). Flore microbienne des laits crus : diversité et influence des conditions de production. pp.67 – 72.

MOREL I., WYSS U. et COLLOMB M, (2006). Influence de la composition botanique de l'herbe et de ces compositions en acides gras du lait.

NOUAILLE S., RIBEIRO L. A., MIYOSHI A., PONTES D., Le LOIR Y., OLIVIERA S. C., LANGELLA P., AZEVEDO V., (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2: 102 – 111.

NOVEL G, (1993). Les bactéries lactiques in « Microbiologie industrielle » les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. LEVEAU, G. V., BOUIX, M. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.

NOVEL G., LEQUERLER J. F., (1995). Les bactéries lactiques. Ed. Press Universitaire de Caen.

OBERMAN H., PIATKIEWCZ A., LIBUDISZ Z., (1982). Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria, 26: 615-623.

PETRANSXIENNE D. et LAPIED., (1981). La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Analyses et tests. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP. 71 – 82.

PHILPEAU G., (1992). Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. Collection STA-ITCF, 63 p.

PIQUE D., PERRET B., LATRILLE E. et CORRIEU G, (1992). Caractérisation et classification des bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification

POOLMAN B., ROYER T. J., MAINZER S. E. et Schmidts B. F., (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of P.E.P dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* 171: 241-253.

RALLU F., Gruss A., ERLISH S. D., MAGNI E., (2000). Acid and multi-stress resistant mutants of *Lactococcus cremoris*: identification of intracellulaire stress signal . *Mol. Microbiol.* 35: 517 – 528.

RAYNAL K et REMEUF F., (2000). Effect of storage of 4 degrees °C on the psychochemical and renniting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. *Journal Dairy Res*, 67 (2): 199-207.

- REYROLLE J., CHOPIN M. C., LETELLIERT., NOVEL G., (1982). LYSOGENIC strains of lactic acid *Streptococci* and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 349 – 356.
- SANDINE W. E., (1985). The Streptococci: milk products. In: *Bacterial starter cultures for foods*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2-23.
- SANDINE W. E., (1988). New nomenclature of the rod- shaped lactic acid bactérie. *Biochimie*, 70: 519-522.
- SAXELIN M., TYNKYEN S., MATTILA–SANHOLM T., De Vos W., (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 16: 204 – 211.
- SCARDOVI V., (1986): Genus *Bifidobacterium*. Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9^{ème} Edition. Vol. Sneath PHA, Mair NS, Sharp ME, Holt JG (Ed). Williams and Wilkins. Publ. Baltimore: 1418 – 1434.
- SCET-AGRI, (1985) : Bilan des ressources hydriques, étude du réaménagement et de l'extension du périmètre du moyen Cheliff. Rap A1-1. Pub, ministère de l'hydraulique PP. 4-28.
- SCHLEIFER K. H, KRAUS J., CVORAKS C., KILPPER -BALZ R., COLLINS M. D. et FISCHER W., (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. Nov. *System. Appl. Microbiol.*, 21 : 183-195.
- SHARP M. E, (1978). The lactic acid bacteria (including Leuconostocs). XX^{ème} congré de laiterie. Paris.
- ST- GELAIS D., A. M. et TURCOT S. M., (1999). Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. *Agriculture et Agro-Alimentaire, Canada*, 1-33.
- ST- GELAIT D D. et SAVOIE L., (1993). Coagulation of milk enriched with low mineral retentate powders. *Milchwissenschaft*, 48 (11) : 603 – 606.
- STADHOUSERS J., (1974). Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft*. 29 : 329-337.
- TAGG J. R. HAJNA AMS et WARM. PNIKER L. W, (1976): Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. ZZ (3): 178 – 180.
- TANAKA H., DESBURG K., IWZAKI T., MIERAU I., (1999). Screenig of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal Dairy Science*, 25-35 p.

TERZAGHI B. F. (1975). Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Applied. Microbiol.* 29 : 807-813.

THOMA T. D. et CROW V. I., (1984). Selection of galactose fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactos-limited chemostat cultures. *Appl. Environ Microbiol.* 48,186-191.

TORMO H., LEKHAL H. A. et LAITHIER C, (2006). Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. Inst de l'élevage. Lyon.

VIGNOLA C. L., MICHEL J. C., PAQUIN P., MOINNEAU M., POULIOT M et SIMPSON R., (2002). Sciences et technologie du lait : Transformation du lait. Techniques et Documentation Lavoisier. 600 p.

WATTIAU M. A., (2000). Mammites : La maladie et sa transmission. Inst : Babcock, L'université de Wisconsin.

WOLFF R. L. et FABIEN R. J., (1998). Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification sub- séquente des acides gras.

ZANATA P. et BASSO A. (1992). A new approach of the characterization of *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* based on acidification rates. *Lait.* 285 – 292.

Annexe 1 : Milieux de cultures

1- Milieu d'isolement :

Tableau 1 : Composition du milieu M17 AGAR (Terzaghi et Sandine, 1975).

Composant	(g/l)
Peptone tryptique de caséine	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure déshydraté	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Agar	15g
Eau distillée	950ml.

On dissout tous les ingrédients du milieu de base dans l'eau distillée, on ajuste le pH à 7,1 à 7,2 puis le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes.

2- Milieu d'identification :

Tableau 2 : Composition de la gélose semi- solide VF : Milieu viande - Foie gélose à 6 ‰

Composants	(g/l)
Extrait de viande - Foie	30g
Glucose	2g
Gélose	6g

Répartir en tubes minces sur 12 cm de hauteur ou en tubes à essai ordinaires. Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Tableau 3 : Composition du lait de Sherman :

Composants	(g/l)
de lait écrémé stérile en tubes.	9ml
de bleu de méthylène à 1 % stérilisé 20 minutes à 120 °C.	1 ml

Tableau 4 : Composition du lait tournesolé :

Composants	(g/l)
Lait écrémé	100
Teinture de tournesol à 4 %	10ml.

Tableau 5 : Composition du lait citrate :

Lait écrémé stérile	5ml
Citrate de sodium	0,25 ml
Gélose blanche	3ml.

Tableau 6 : Composition du milieu de Gibson et Abd El Malek :

Composants	(g/l)
- Extrait de levure	2,5g
- Glucose	50g
- Jus de tomate à pH 6,5	100ml
-Lait	800ml
- Gélose nutritive ordinaire	200 ml.

PH 6,5 ; répartir en tubes à essai (8 à 10 ml). Stériliser par tyndallisation, 3 fois 30 minutes à 100 °C, à 24 heures d'intervalle.

Tableau 7 : Profil fermentaire : Eau peptonnée au pourpre de bromocrésol

Composants	(g/l)
- Peptone	10g
-NaCl	5g
- Pourpre de bromocrésol	0,20 g.

PH 7 ; répartir en tubes, autoclaver à 115 °C pendant 20 minutes. Avant l'emploi ajouter par tube 1 ml de solution de sucre .

3 -Milieux de conservation :

Tableau 8 : Composition du milieu LTSG :

Composants	(g/l)
- Lait écrémé	100g
- Teinture de tournesol	2g
- Glucose	5g
- Glycérol	100ml
- Eau distillée	1000ml.

Autoclaver à 115 °C pendant 15 minutes.

Tableau 9 : Composition du lait écrémé :

Composants	(g/l)
Lait écrémé en poudre	100g
Eau distillée	1000ml

Autoclaver à 115 °C pendant 20 minutes.

Tableau 10 : Indicateurs utilisés

	Couleur de la molécule à pH acide	Couleur de l'ion pH alcalin	Zone de virage
Tournesol	Rouge	bleu	4,5-8,3
Pourpre de bromocrésol	Jaune	violet	6,5

Annexe 2 :

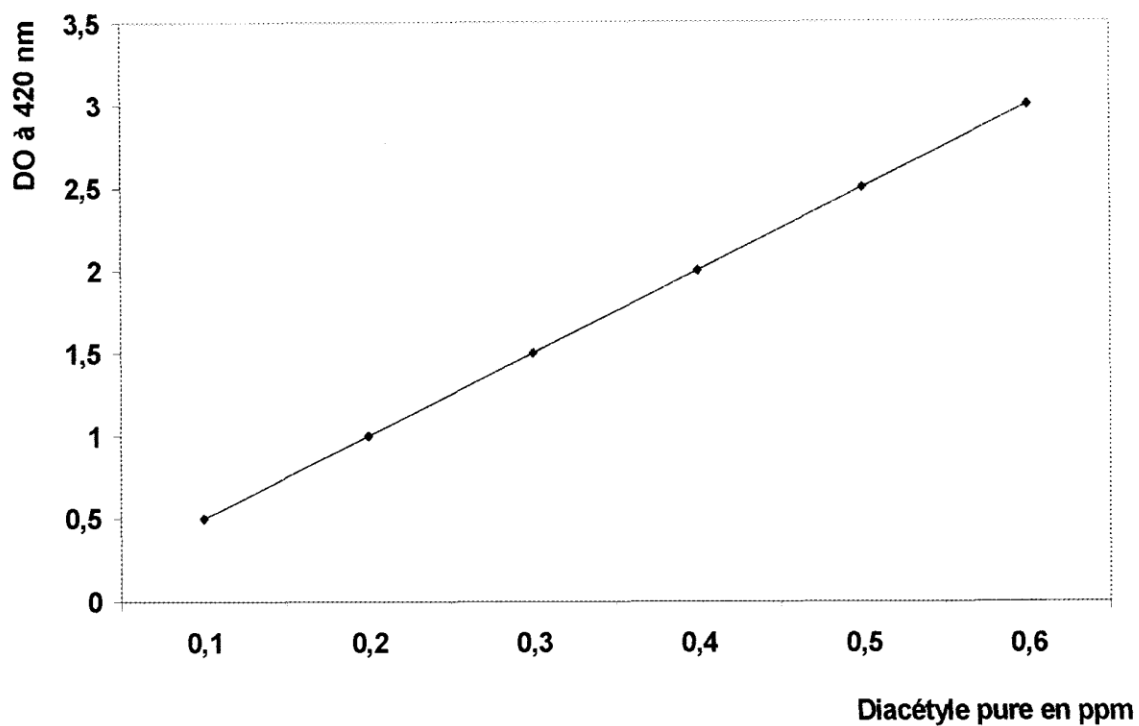


Figure 01 : Droite d'étalonnage (dosage du diacétyle).

Annexe 3 :**Tableau 10 :** Evolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques, en fonction du temps, à 30°C.

	0	2	4	6	8	24
<i>Lc.L1</i>	17	24	27	30	37	82
<i>Lc.L2</i>	17	22	26	30	42	79
<i>Lc.L3</i>	18	23	25	29	45	78
<i>Lc.L4</i>	16	25	27	30	36	80
<i>Lc.L5</i>	19	22	25	28	44	77
<i>Lc.L6</i>	17	23	26	29	34	75
<i>Lc.L7</i>	15	23	28	31	42	85
<i>Lc.L8</i>	18	24	27	29	39	77
<i>Lc.L9</i>	16	22	30	34	48	89
<i>Lc.L10</i>	20	22	26	28	36	76
<i>Lc.L11</i>	15	23	26	29	32	79
<i>Lc.L12</i>	18	22	26	29	39	82
<i>Lc.L13</i>	17	24	29	32	44	87
<i>Lc.L14</i>	18	21	25	29	32	69
<i>Lc.L*</i>	16	21	32	42	52	86
<i>Lc. I1</i>	17	19	24	27	44	57
<i>Lc.C2</i>	16	17	26	29	46	60
<i>Lc.C3</i>	17	18	25	28	45	58
<i>Lc.C*</i>	16	18	24	27	43	58
<i>Lc.D1</i>	16	17	19	23	31	41
<i>Lc.D2</i>	15	18	20	24	34	44
<i>Lc.D3</i>	15	17	19	24	32	42
<i>Lc.D4</i>	17	18	19	22	31	40

Annexe 4 :**Tableau 12 :** Statistiques sommaires des variables continues

Variabes	Effectif	Poids	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Vm	23	23.00	2.270	0.903	0.750	4.160
pHm	23	23.00	5.496	0.400	4.750	6.200
Tm	23	23.00	8.522	6.275	4.000	24,000
pHf	23	23.00	4.437	0.324	4.000	5.200
μ	23	23.00	0.364	0.024	0.330	0.430

Annexe 5 :**Tableau 13 :** Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles).

	0	4	8	24	48	72	96
<i>Lc.L1</i>	6,61	6,01	5,41	4,21	4,10	4,12	4,13
<i>Lc.L2</i>	6,60	6,10	5,92	4,30	4,00	4,07	4,10
<i>Lc.L3</i>	6,60	6,51	5,20	4,35	4,12	4,07	4,09
<i>Lc.L4</i>	6,62	6,20	5,46	4,24	4,05	4,10	4,15
<i>Lc.L5</i>	6,56	6,09	4,75	4,42	4,29	4,18	4,25
<i>Lc.L6</i>	6,54	6,20	5,15	4,46	4,37	4,27	4,28
<i>Lc.L7</i>	6,63	5,98	4,70	4,15	4,10	4,10	4,10
<i>Lc.L8</i>	6,55	6,19	5,12	4,45	4,17	4,20	4,22
<i>Lc.L9</i>	6,65	6,00	5,80	4,00	3,95	3,50	3,40
<i>Lc.L10</i>	6,54	6,20	5,15	4,46	4,30	4,12	4,19
<i>Lc.L11</i>	6,40	5,50	4,75	4,25	4,20	4,16	4,14
<i>Lc.L12</i>	6,60	5,98	5,00	4,21	4,22	4,22	4,22
<i>Lc.L13</i>	6,30	5,30	4,50	4,10	4,15	4,17	4,17
<i>Lc.L14</i>	6,60	5,80	5,10	4,50	3,80	3,50	3,10
<i>Lc.L*</i>	6,60	6,02	5,40	4,20	4,00	3,80	3,50
<i>Lc.Cl</i>	6,55	6,30	5,40	4,37	4,20	4,17	4,22
<i>Lc.C2</i>	6,56	6,20	5,40	4,32	4,00	4,10	4,13
<i>Lc.C3</i>	6,50	6,23	5,64	4,35	4,01	4,19	4,22
<i>Lc.C*</i>	6,64	6,40	5,80	4,38	4,22	4,17	4,17
<i>Lc.D1</i>	6,58	6,50	6,41	5,15	4,76	4,67	4,67
<i>Lc.D2</i>	6,48	6,08	5,08	4,88	4,85	4,50	4,50
<i>Lc.D3</i>	6,58	6,51	6,18	5,10	4,94	4,30	4,29
<i>Lc.D4</i>	6,57	6,49	6,37	5,20	4,85	4,37	4,30

Annexe 6 :**Tableau 14** : Evolution du pH à 21 °C , en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles).

	0	4	8	24	48	72	96
<i>Lc.L1</i>	6,62	6,50	6,40	5,50	4,98	4,50	4,14
<i>Lc.L2</i>	6,61	6,50	6,30	5,15	5,00	4,46	4,12
<i>Lc.L3</i>	6,60	6,10	5,15	5,28	5,00	4,30	4,10
<i>Lc.L4</i>	6,64	6,20	6,00	5,40	5,00	4,40	4,17
<i>Lc.L5</i>	6,59	6,40	5,99	5,44	4,70	4,34	4,28
<i>Lc.L6</i>	6,62	6,40	6,00	5,87	4,48	4,32	4,28
<i>Lc.L7</i>	6,63	6,40	6,10	5,10	4,90	4,30	4,10
<i>Lc.L8</i>	6,60	6,30	6,01	5,40	4,80	4,42	4,24
<i>Lc.L9</i>	6,65	6,45	6,00	5,60	4,80	4,05	4,00
<i>Lc.L10</i>	6,58	6,50	6,00	5,98	4,80	4,39	4,20
<i>Lc.L11</i>	6,41	5,90	5,38	5,00	4,60	4,28	4,16
<i>Lc.L12</i>	6,62	6,54	6,47	5,50	4,98	4,20	4,10
<i>Lc.L13</i>	6,34	6,00	5,88	5,30	4,75	4,20	4,17
<i>Lc.L14</i>	6,60	6,50	6,00	5,00	4,10	4,00	3,50
<i>Lc.L*</i>	6,59	5,80	5,10	4,35	4,20	4,18	4,18
<i>Lc.C1</i>	6,63	6,57	6,02	5,01	4,49	4,32	4,22
<i>Lc.C2</i>	6,58	6,00	5,47	4,22	4,23	4,25	4,21
<i>Lc.C3</i>	6,51	6,40	6,20	5,48	5,37	5,00	4,22
<i>Lc.C*</i>	6,62	6,50	5,90	5,00	4,30	4,25	4,18
<i>Lc.D1</i>	6,58	6,54	6,52	5,40	5,00	4,90	4,67
<i>Lc.D2</i>	6,52	6,50	6,00	5,50	5,00	4,88	4,50
<i>Lc.D3</i>	6,60	6,57	6,01	5,60	5,05	4,80	4,30
<i>Lc.D4</i>	6,60	6,55	6,11	5,60	5,02	4,70	4,34

Annexe 7 :

Tableau 15 : évolution de la croissance, en fonction du temps, des cultures pures de lactocoques (locales et industrielles), à 30 °C.

<i>Souches</i>	<i>Temps en h</i>	<i>Log du nombre de cellules/ml</i>
<i>Lc.L1</i>	0	6.99
	2	7.08
	3	7.08
	6	8.11
	9	8.20
	24	9.20
<i>Lc.L2</i>	0	7
	2	7.06
	3	7.06
	6	8.22
	9	8.32
	24	8.78
<i>Lc.LB</i>	0	7.01
	2	7.43
	3	7.85
	6	8.19
	9	8.24
	[24	8.88
<i>Lc.L4</i>	0	7
	2	7.04
	3	7.14
	6	7.99
	9	8.22
	24	8.75
<i>Lc.L5</i>	0	6.82
	2	7.06
	3	7.56
	6	8.18
	9	8.33
	24	8.70
<i>Lc.L6</i>	0	7.0
	2	7.04
	3	7.04
	6	7.49
	9	7.79
	24	8.11
<i>Lc.L7</i>	0	7.0
	2	7.04
	3	7.04
	6	8.19
	9	8.25
	24	8.56

Souches	Temps en h	Log du nombre de cellules/ml
Lc.L8	0	7.07
	2	7.26
	3	7.26
	6	7.86
	9	8.12
	24	8.41
Lc.L9	0	6.67
	2	6.99
	3	6.99
	6	9.00
	9	9.00
	24	9.45
Lc.L10	0	6.85
	2	7.01
	^>	7.01
	6	8.13
	9	8.14
	24	8.56
Lc.L11	0	7.02
	2	7.06
	->	7.06
	6	8.15
	9	8.15
	24	8.22
Lc.L12	0	7.0
	2	7.02
	3	7.13
	6	8.00
	9	8.00
	24	8.31
Lc.L13	0	7.05
	2	7.09
	^>	7.09
	6	8.18
	9	8.18
	24	8.26
Lc.L14	0	6.95
	2	7.09
	3	7.09
	6	7.65
	9	8.09
	24	8.66

Souches	Temps en h	Log r/« nombre de cellules/ml
Lc.DB	0	6.87
	2	7.01
	••>	7.32
	6	7.43
	9	7.43
	24	7.88
Lc.D-f	0	6.97
	2	7.00
	3	7.12
	6	7.52
	9	7.52
	24	7.77

Annexe 8 :

Tableau 16: Taux de croissance, en fonction du temps ,des cultures pures de lactocoques (souches locales et industrielles), à 30 °C.

Souches	Temps en h-1	Tflwjc <fe croissance
Lc.L1	3	0.38
	6	0.19
	21	0.061
Lc.L2	3	0.38
	6	0.19
	21	0.059
Lc.L3	3	0.34
	6	0.17
	21	0.053
Lc.14	3	0.37
	6	0.19
	21	0.058
Lc.L5	3	0.36
	6	0.18
	21	0.054
Lc.L6	3	0.35
	6	0.18
	21	0.054
Lc.L7	3	0.38
	6	0.195
	21	0.058
Lc.L8	3	0.36
	6	0.186
	21	0.055
Lc.L9	3	0.43
	6	0.21
	21	0.064

Souches	Temps en h-1	Taux de croissance
Lc.L10	3	0.38
	6	0.19
	21	0.058
Lc.L11	3	0.38
	6	0.192
	21	0.055
Lc.L12	3	0.37
	6	0.187
	21	0.554
Lc.L13	3	0.38
	6	0.192
	21	0.055
Lc.L14	3	0.36
	6	0.190
	21	0.058
Lc.L*	3	0.40
	6	0.20
	21	0.062
Lc.C1	-5	0.35
	6	0.18
	21	0.052
Lc.C2	3	0.38
	6	0.179
	21	0.052
Lc.C3	3	0.33
	6	0.178
	21	0.051
Lc.C*	3	0.355
	6	0.177
	21	0.051
Lc.D1	3	0.33
	6	0.175
	21	0.049
Lc.D2	3	0.33
	6	0.165
	21	0.047
Lc.D3	3	0.33
	6	0.165
	21	0.047
Lc.D-4	3	0.35
	6	0.1652
	21	0.051

Annexe 9 :

Figure 2 : Mécanisme de résistance à l'acide lactique induit par CitP chez *Le. Diacetylactis*

Source : Magni et al, (1999)

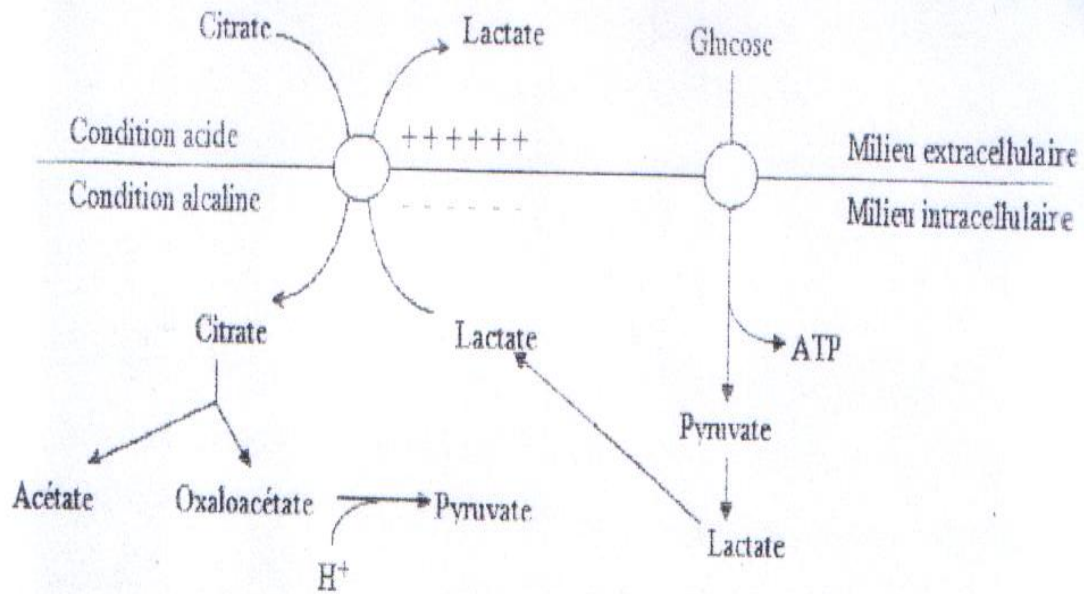


Figure 2 : Mécanisme de résistance à l'acide lactique induit par CitP chez *Lc. Diacetylactis*

Source : Magni et al, (1999)

RESUME

L'étude réalisée vise deux objectifs : isolement et caractérisation phénotypiques et technologique des souches de bactéries lactiques mésophiles locales à partir de laits de vache, de chèvre et de brebis et la répartition de ces souches dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons.

L'identification a abouti à la collection de 21 souches locales présentant dans l'ensemble des propriétés technologiques considérables. L'analyse en composantes principales a permis de répartir ces souches en trois groupes distincts selon leur vitesse d'acidification. Grâce au système d'information géographique, nous avons pu cartographier la répartition de ces souches dans le périmètre du moyen Cheliff en fonction des saisons et de l'origine animale. Cette distribution est influencée par une combinaison de plusieurs facteurs : les pratiques d'élevage, le climat, l'origine et la race animale.

Mots clés : bactéries lactiques mésophiles, périmètre du moyen Cheliff, lait de vache, lait de chèvre, lait de brebis

Abstract

The study carried out has two aims: phenotypical isolation and characterization and technological of the lactic stocks of local bacteria mesophiles starting from ewe and goat, cow's milks and the distribution of these stocks in the perimeter of the Cheliff means according to the seasons.

Identification a leads to the collection of 21 local stocks presenting in the whole of the considerable technological properties. The analysis in principal components made it possible to distribute these stocks in three distinct groups according to their speed of acidification. Thanks to the geographical information system, we could chart the distribution of these stocks in the perimeter of the Cheliff means according to the seasons and the animal origin. This distribution is influenced by a combination of several factors: practices of breeding, climate, the origin and the animal race.

Key words: lactic bacteria mesophiles, perimeter of the Cheliff means, cow's milk, goat's milk, ewe's milk