

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Par

Mme Fadhila SADI

Thème :

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE BACTERIES
LACTIQUES À CARACTERES TECHNOLOGIQUE ET PROBIOTIQUE**

Soutenue le 23/10/2017, devant le jury composé de :

Malika KOÏCHE	MCA	Université U.H.B Chlef	Président
Abdelkader DILMI BOURAS	Professeur	Université U.H.B Chlef	Rapporteur
Omar AOUN	MCA	Université Khemis Miliana	Examineur
Farid DAHMOUNE	MCA	Université Bouira	Examineur
Mohamed LAZALI	MCA	Université Khemis Miliana	Examineur
Abdelkader MEZAÏNI	MCA	Université U.H.B Chlef	Examineur
Malika MEZIANE	MCA	Université U.H.B Chlef	Invitée

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

En préambule à cette thèse je remercie "Allah" tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail durant ces longues années d'étude.

*Tout d'abord, Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance à mon Enseignant et Directeur de thèse Monsieur le **Professeur Abdelkader DILMI BOURAS**, pour ses conseils avisés et la rigueur avec laquelle il a encadré ce travail. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude pour m'avoir permise de terminer ce travail dans les meilleures conditions.*

*Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à la directrice de l'unité de recherche **Professeur Annie DARY-MOUROT** de m'avoir accueilli au sein de l'URAFPA (Unité Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux) de Nancy- Université.*

Mes remerciements s'adressent aux membres de la commission d'examen qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de m'avoir accordé de leur temps si précieux :

***Dr. Malika KOÏCHE**, Maitre de conférences 'A' à l'Université U.H.B Chlef, **Dr. Farid DAHMOUNE**, Maitre de conférences 'A' à l'Université de Bouira ; **Dr. Omar AOUN**, Maitre de conférences 'A' à l'Université de Khemis Miliana, **Dr. Mohamed LAZALI**, Maitre de conférences 'A' à l'Université de Khemis Miliana et **Dr. Abdelkader MEZAINI**, Maitre de conférences 'A' à l'Université U.H.B Chlef. Je remercie particulièrement **Dr. Malika MEZIANE**, Maitre de conférences 'A' à l'Université U.H.B Chlef d'avoir fait partie de mon comité de thèse.*

*Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe PB2P "Protéolyse-Biofonctionnalité des Protéines et Peptides", à savoir **Dr. Clarisse PERRIN**, **Jean-Michel GIRARDET**, et plus particulièrement **Dr. Émeline ROUX** pour son aide précieuse, son extrême gentillesse et sa noblesse.*

*J'exprime toute ma gratitude à **Aude FERBUS** et **Geoffrey** pour leur soutien, les moments de partage et d'amitiés.*

*Je tiens à adresser un immense merci à **Faiza, khadija LEGRANI** et **Céline CAKIR-KIEFER** pour leur soutien scientifique inconditionnel, mais aussi moral. Merci pour tous les bons moments passés ensemble.*

*J'exprime mes sincères remerciements à **Faiza Nawel GHOMARI**, **Faiza HALLOUZ** pour leurs aides et leurs conseils qui ont assuré la réussite de ce travail. Merci aussi pour votre soutien, votre gentillesse et votre humour. Je tiens spécialement à remercier **Samira BRAHIMI** pour sa gentillesse, ses commentaires et ses précieux conseils sur ce travail.*

*Mes très spéciaux remerciements reviennent à **ma famille**, à mes **chers parents** pour l'affection dont ils m'ont toujours comblée, à **mon mari**, en reconnaissance de soutien et encouragement, que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon respect, à **mes sœurs** et **mon frère**, avec tous mes vœux de réussite et de bonheur, à **mes enfants Mohammed Baraa** et **Mayar** avec tout mon attachement, mon amour et ma tendresse.*

Pour ceux que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront, j'exprime toute ma gratitude.

Résumé

Ce travail nous a permis d'apprécier la flore microbiologique en bactéries lactiques présentes dans le lait cru des populations bovines (brune de l'Atlas) et caprines (Kabyle et Arabia) locales à partir d'échantillons provenant de la région de Ain-defla. D'un total de 66 souches isolées et purifiées, nous avons caractérisé vingt souches appartenant au groupe des bactéries lactiques. L'identification des souches basée sur les caractères morphologiques et sur les différents métabolismes biochimiques nous a permis de les rapprocher aux espèces suivantes: *Lb. plantarum* - *Lb. casei* - *St. thermophilus* - *Ln. pseudomesenteroides* - *Lc. lactis* subsp. *lactis* - *Pc. parvulus* - *Lb. paracasei* - *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* - *Lb. animalis* et *Lb. acidophilus*. La caractérisation moléculaire par le séquençage partiel de 16S rDNA a abouti à l'identification de huit lactobacilles. L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir de leurs séquences a démontré leur affiliation à quatre groupes distincts à l'intérieur du genre *Lactobacillus*. Ils peuvent constituer, ainsi, de nouvelles espèces. Par la suite, nous avons examiné certaines caractéristiques technologiques pouvant être utilisées à des fins industrielles. Leur évaluation a mis en évidence l'existence de bonnes fonctionnalités : la majorité des souches ont la capacité de produire l'acétoïne et les exopolysaccharides(EPS). La quantité la plus élevée des EPS a été produite par V2 avec 4,13g/L suivie par V7 avec 3,29g/L. Toutes les souches ont exprimé une bonne activité protéolytique avec des zones de lyse allant de 169 à 625mm² sur MRS au lait. Cependant, ces pouvoirs varient selon la souche, même à l'intérieure de la même espèce. La production la plus élevée des protéases exocellulaires chez les huit lactobacilles identifiés phénotypiquement et génotypiquement a été trouvée entre 24h et 30h dont V2 atteint un taux de 2,48 et 3,00U/mL respectivement. De même, ils ont montré une activité acidifiante appréciable où ils peuvent réduire le pH à des valeurs inférieures à 6 (entre 5,43 et 4,55) après 6 heures d'incubation et peuvent coaguler le lait après 24heures d'incubation. Enfin, le profil probiotique de onze souches sélectionnées et leurs cultures mixtes a été examiné, *in vitro*, afin d'évaluer leur intérêt pour une éventuelle utilisation. Elles sont criblées pour leur tolérance au pH acide et aux sels biliaries, leur hydrophobicité vis-à-vis du xylène et de l'antagonisme. La caractérisation de l'agent inhibiteur a permis de déterminer que l'activité antibactérienne des différentes cultures est due à la présence de substances antibactériennes dans le surnageant qui peut être le peroxyde d'hydrogène ou d'autres substances protéiques comme les bactériocines. Plusieurs souches ont montré un potentiel probiotique, celles qui ont donné les meilleurs résultats sont *Lb. plantarum* C7, C8 et *Lb. casei* C5.

Mots clés : lait cru, bactéries lactiques, identification, gène 16S rDNA, probiotique.

Abstract

This work allowed us to appreciate the microbiological flora of lactic bacteria present in the raw milk of the local bovine (brown Atlas) and caprine (Kabyle and Arabia) populations from samples from the Khemis-Miliana region. Of a total of 66 strains isolated and purified, we characterized twenty (20) strains belonging to the group of lactic acid bacteria. The identification of the strains, based on the morphological characteristics and on the various biochemical metabolisms, allowed us to bring them closer to the following species: *Lb. plantarum*- *Lb. casei* - *St. thermophilus* - *Ln. pseudomesenteroides* - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* - *Pc. parvulus* - *Lb. paracasei* - *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* - *Lb. animalis* and *Lb. acidophilus*. Molecular characterization by the sequencing of 16S rDNA resulted in the identification of eight lactobacilli. The establishment of a phylogenetic tree constructed from their sequences has demonstrated their affiliation to four distinct groups within the genus *Lactobacillus*. They may thus constitute new species. Subsequently, we examined some of the technological characteristics for industrial purposes. Their evaluation revealed the existence of good functionalities: most strains have the ability to produce acetoin and exopolysaccharides (EPS). The highest amount of EPS was produced by V2 with 4.13g / L followed by V7 with 3.29g / L. All strains showed good proteolytic activity with lysis zones ranging from 169 to 625 mm² on MRS-milk. However, these powers vary according to the strain, even within the same species. The highest production of exocellular proteases in the eight lactobacilli identified phenotypically and genotypically was found between 24h and 30h, of which V2 reached a level of 2.48 and 3.00 U / mL respectively. Likewise, they showed an appreciable acidifying activity where they can reduce the pH to values lower than 6 (between 5.43 and 4.55) after 6 hours of incubation and can coagulate the milk after 24 hours of incubation. Finally, the probiotic profile of 11 selected strains and their mixed cultures was examined, *in vitro*, in order to evaluate their interest for possible use. They are screened for their tolerance to acidic pH and bile salts, their hydrophobicity against xylene and antagonism. The characterization of the inhibiting agent made it possible to determine that the antibacterial activity of the different cultures is due to the presence of antibacterial substances in the supernatant which may be hydrogen peroxide or other proteinaceous substances such as bacteriocins. Several strains have shown probiotic potential; those that have given the best results are *Lb. plantarum* C7, C8 and *Lb. casei* C5.

Key words: raw milk, lactic acid bacteria, identification, 16S rDNA gene, probiotic.

الملخص

هذا العمل أتاح لنا تقييم الفلورا الميكروبيولوجية من حيث البكتريا اللبنية الموجودة في الحليب النيء لسلاسل محلية من البقر (سمراء الأطلس) والماعز (القبايلية و العربية) من منطقة عين الدفلى . من بين 66 سلالة معزولة، تم تحديد عشرين (20) سلالة تنتمي إلى مجموعة بكتريا حمض اللبن. المعايير المورفولوجية ومختلف التفاعلات الأيضية البيو كيميائية سمحت لنا بتصنيفها إلى الانواع التالية :

Lb. plantarum - *Lb. casei* - *St. thermophilus* - *Ln. pseudomesenteroides*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* - *Pc. parvulus* - *Lb. paracasei* - *Lb. animalis* - *Lb. acidophilus*
. *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*

لقد أدى التوصيف الجزيئي من الحمض النووي 16S rDNA إلى تحديد ثمانية من العصيات اللبنية و أثبتت شجرة النشوء والتطور التي شيدت من تسلسل القواعد لهذه العصيات انتماؤهم إلى أربع مجموعات متميزة داخل جنس *Lactobacillus* ويمكن أن تكون، أيضا، نوعا جديدا. بعدها، درسنا لدى جميع السلالات بعض المزايا التكنولوجية التي يمكن استخدامها للأغراض الصناعية. كشف تقييمها وجود ميزات جيدة : معظم السلالات لديها القدرة على إنتاج الأسيتون و متعدد السكريات الخارجي (EPS) حيث تم إنتاج أعلى كمية من EPS بواسطة V2 مع g / L4.13 تليها V7 مع g / L3.29. وأعربت جميع السلالات عن وجود نشاط جيد لهدم البروتين مع مناطق تحلل تتراوح بين 169 إلى 625 ملم² على MRS-حليب. ومع ذلك، تختلف هذه الميزات مع اختلاف السلالة حتى داخل نفس النوع. تم العثور على أعلى إنتاج من البروتين الخارجي للعصيات الثمانية المعرفة ظاهريا ووراثيا ما بين 24 ساعة و 30 ساعة، منها V2 وصلت إلى مستوى 2.48 و 3.00 وحدة / مل على التوالي. وبالمثل، أظهروا نشاطا حمضيا ملحوظا حيث يمكنهم خفض pH إلى قيم أقل من 6 (بين 4.5 و 5.5) بعد 6 ساعات من الحضانة ويمكن تخثر الحليب بعد 24 ساعة من الحضانة. وأخيرا، تم فحص الخصائص البروبيوتكية مخبريا لأحد عشر سلالة مختارة والخمائر المختلطة لغرض تقييمها واستخدامها المحتمل حيث تمت دراسة مقاومتها لدرجة الحموضة والأملاح الصفراوية، درجة الالتصاق بالمركبات العضوية والتضاد. توصيف العامل المثبط سمح بإرجاع النشاط المضاد للبكتيريا لمختلف الخمائر إلى وجود مواد مضادة للجراثيم التي قد تكون بيروكسيد الهيدروجين أو غيرها من المواد البروتينية مثل bacteriocines. أظهرت عدة سلالات خصائص بروبيوتكية ، وتلك التي أعطت أفضل النتائج هي : *Lb. plantarum* C7, C8 et *Lb. casei* C5

الكلمات المفتاحية: الحليب النيء ، بكتيريا حمض اللبن ، الخصائص ، 16S rDNA ، البروبيوتيك.

Liste des abréviations et acronymes

ADH	:	Arginine DiHydrolase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNr	:	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFSSA	:	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNr	:	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC	:	American Type Culture Collection
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
BSH	:	Biles salts hydrolase
°C	:	Degré Celsius
CM	:	Culture mixte (Mixed culture)
CO₂	:	Dioxyde de carbone
°D	:	Degré dornic
dNTP	:	Désoxynucléotide triphosphate
DO	:	Densité Optique
E.	:	<i>Escherichia</i>
EDTA	:	Ethylène diamine tétra-acétate
EFSA	:	European food safety authority-Autorité européenne de sécurité des aliments
En.	:	<i>Enterococcus</i>
EPS	:	Exopolysaccharide
FAO :	:	Food and agriculture organization-Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
GC%	:	Pourcentage en guanine et cytosine
GRAS	:	Generally Regarded As Safe
h, min, s	:	heure, minute, seconde
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
g, mg, µg, ng	:	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
Kb	:	Kilobase
Lb.	:	<i>Lactobacillus</i>
Lc.	:	<i>Lactococcus</i>
Ln.	:	<i>Leuconostoc</i>
L, mL, µL	:	Litre, millilitre, microlitre
M17	:	Milieu liquide- Streptocoques
mm, cm, nm	:	millimètre, centimètre, nanomètre
Mb	:	Mégabase
MG	:	Matière Grasse
MM	:	Matière Minérale
M, mM	:	Molaire, millimolaire
MRS	:	de Man-Rogosa et Sharp
m/v	:	masse par volume
N	:	Normalité
NaOH	:	Hydroxyde de sodium
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
P.	:	<i>Pediococcus</i>
pb	:	paires de base
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pH	:	potentiel Hydrogène
RDP	:	Ribosomal Database Project
rpm	:	Revolutions per minute, Tours par minute
S.	:	<i>Staphylococcus</i>
SDS	:	Sodium dodecyl sulfate

sp.	:	Espèce non précisée
ssp.	:	Sous espèce
SSU for	:	Sous unité forward
SSU rev	:	Sous unité reverse
St.	:	<i>Streptococcus</i>
Subsp	:	Subspecies, Sous-espèce
Taq	:	De <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	:	Acide Trichloroacétique
TE	:	Tris Acétate
TEA	:	Tris Acétate EDTA
U	:	Unité
v/v	:	Volume par volume
WHO	:	World Health Organization (OMS)- Organisation Mondiale de la Santé

Liste des figures

Figure 1: Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « <i>Lactobacillales</i> » dans la classe des « <i>Bacilli</i> » (De Vos et <i>al.</i> , 2009).....	12
Figure 2: Modèle de structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique des procaryotes. Les dénominations "V" correspondent aux régions variables (Tiré des travaux de Pace et Burpin, 1990).....	14
Figure 3: Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose	19
Figure 4: Principales voies métaboliques des bactéries lactiques (Thompson et Gentry Weeks, 1994).....	20
Figure 5: Critères de sélection des probiotiques (Milette, 2007).....	23
Figure 6: Représentation schématique des protéases de parois (Siezen., 1999 ; Savijoki et <i>al.</i> , (2006).....	25
Figure 7: Modèle présentant la régulation de l'expression des gènes du régulon protéolytique de <i>Lc. lactis</i>	27
Figure 8 : Programme PCR suivi pour amplifier le gène 16S rDNA des souches étudiées.....	37
Figure 9: Aspect des coloniesensemencées en surface après 48h d'incubation à 30°C	46
Figure 10 : Observations microscopiques des bactéries lactiques isolées après la coloration de Gram au Gx100.....	46
Figure 11: Migration sur gel d'agarose des ADNr 16S amplifiés des souches examinées	52
Figure 12: Traitement avec le logiciel BioEdit des chromatogrammes obtenus pour les séquences partielles du gène 16S rDNA.....	53
Figure 13: Exemple d'une séquence nucléotidique de la souche <i>Lactobacillus casei</i> C4 après analyse et traitement par le logiciel BioEdit.....	53
Figure 14: Exemple de résultat de BLAST de NCBI des séquences partielles du 16S rDNA (Souche C7)	54

Figure 15: Arbre phylogénétique des séquences partielles du gène 16S rRNA des souches examinées en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) avec <i>Bacillus subtilis</i> comme groupe extérieur, outgroup	56
Figure 16: Activité protéolytique des cellules et des surnageants (mm ²) des isolats lactiques.....	62
Figure 17: Evolution de l'activité protéolytique (Unités/mL) des souchesensemencées dans le bouillon MRS à 37°C	65
Figure 18: Résistance des différentes cultures aux milieux acides.....	70
Figure 19: Résistance des différentes cultures aux sels biliaires à 0,3%	71
Figure 20: Hydrophobicité des cultures vis -à-vis le Xylène	73

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces (g/L) (Alves de Oliveira, 2007).....	5
Tableau 2: Biodiversité spécifique des bactéries lactiques dans des laits crus de vache, chèvre, brebis d'après : (1) Bouton et <i>al.</i> , (2006); Dalmasso et <i>al.</i> , (2008); Rasolofo et <i>al.</i> , (2010); (2) Badis et <i>al.</i> , (2004); Callon et <i>al.</i> , (2007); (3) Caridi et <i>al.</i> , (2003); Feutry et <i>al.</i> , (2010).....	6
Tableau 3: Les souches lactiques de la race Kabyle (Badis et <i>al.</i> , 2005).....	6
Tableau 4: Les souches lactiques de la race Arabia (Badis et <i>al.</i> , 2005).....	7
Tableau 5: Quelques caractéristiques de bactéries lactiques (Von Wright et Axelsson, 2012).....	11
Tableau 6: Préparation des échantillons pour la PCR.....	37
Tableau 7: Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques isolées.....	49
Tableau 8: Récapitulatif des résultats d'identification phénotypique et génotypique des souches isolées	55
Tableau 9: Différentes propriétés technologiques des souches isolées.....	59
Tableau 10: Activité acidifiante de 8 lactobacilles après 6 et 24 heures d'incubation.....	64
Tableau 11: Résistance des souches aux antibiotiques.....	68
Tableau 12: Activité antibactérienne des souches pures et les cultures mixtes et sur les germes indicatrices (mm).....	75
Tableau 13: Activité inhibitrice des surnageants natifs (mm).....	76

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	iii
ملخص	
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Introduction générale	1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Lait cru	4
1.1. Qualité nutritionnelle	4
1.2. Composition du lait	4
2. Diversité et rôle de la microflore des laits crus	5
3. Races bovines et caprines locales	7
4. Bactéries Lactiques	9
4.1. Caractéristiques générales	9
4.2. Taxonomie	10
4.3. Identification moléculaire	13
4.4. Présentation des principaux genres utilisés dans ce travail	15
4.4.1. <i>Lactobacillus</i>	15
4.4.2. <i>Leuconostoc</i>	16
4.4.3. <i>Streptococcus</i>	17
4.4.4. <i>Pediococcus</i>	17
4.4.5. <i>Lactococcus</i>	17
5. Propriétés métaboliques recherchées chez les bactéries lactiques	18
6. Croissance des bactéries lactiques dans le lait et Protéolyse	23
6.1. Protéases de paroi et système de transport des peptides	24
6.2. Peptidases	26
7. Conséquences technologiques de la protéolyse	27

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel	29
1.1. Source de lait	29
1.2. Milieux de culture	29
2. Méthodes	30
2.1. Caractérisation phénotypique, moléculaire et technologique des souches isolées à partir de lait cru de populations locales	30
2.1.1. Caractérisation phénotypique	30
2.1.1.1. Isolement et purification	30
2.1.1.2. Examen macroscopique	30
2.1.1.3. Examen microscopique	30
2.1.1.4. Recherche de la catalase	31
2.1.1.5. Recherche de l'oxydase	31
2.1.1.6. Recherche de la nitrate-réductase	31
2.1.1.7. Conservation	32
2.1.1.8. Identification des isolats	32
2.1.1.8.1. Croissance à différentes températures	32
2.1.1.8.2. Type fermentaire	32
2.1.1.8.3. Croissance des souches dans des conditions hostiles	33
2.1.1.8.3.1. Croissance à différents pH	33
2.1.1.8.3.2. Culture sur milieu hypersalé	33
2.1.1.8.3.3. Croissance sur le lait bleu de Sherman	33
2.1.1.8.3.4. Résistance au tellurite	33
2.1.1.8.4. Activité Arginine dihydrolase (ADH)	34
2.1.1.8.5. Hydrolyse de l'esculine	34
2.1.1.8.6. Recherche de la Citratase	34
2.1.1.8.7. Croissance sur lait tournesolé	34
2.1.1.8.8. Profil fermentaire des sucres	35
2.1.2. Caractérisation moléculaire (Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA)	35
2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique	35
2.1.2.2. Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA	36
2.1.2.3. Electrophorèse d'ADN	37
2.1.2.4. Phylogénie moléculaire du gène 16S rDNA	38

2.1.3. Caractérisation technologique	38
2.1.3.1. Production d'arômes	38
2.1.3.2. Production des exopolysaccharides (dextrane).....	38
2.1.3.3. Lipolyse.....	39
2.1.3.4. Mise en évidence de la protéolyse	39
2.1.3.4.1. Cellules bactériennes.....	39
2.1.3.4.2. Dans les surnageants des cultures	40
2.1.3.5. Mise en évidence de la relation entre le pouvoir acidifiant et la production des protéases	40
2.1.3.5.1. Pouvoir acidifiant.....	40
2.1.3.5.2. Dosage de l'activité protéolytique.....	40
2.2. Mise en évidence, <i>in vitro</i>, de quelques propriétés probiotiques	41
2.2.1. Aspect sanitaire	41
2.2.1.1. Hémolyse.....	41
2.2.1.2. Résistance aux antibiotiques	41
2.2.2. Tolérance à l'acidité	42
2.2.3. Résistance aux sels biliaires.....	42
2.2.4. Test d'hydrophobicité.....	42
2.2.5. Activité antibactérienne.....	43
2.2.5.1. Effet des cellules bactériennes	43
2.2.5.2. Effet de surnageant.....	43
2.3. Traitement des données et Analyse statistique	44

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Caractérisation phénotypique, moléculaire et technologique des souches isolées à partir de lait cru de populations locales	45
1.1. Caractérisation phénotypique	45
1.1.1. Isolement.....	45
1.1.2. Identification phénotypique des bactéries lactiques isolées	45
1.1.2.1. Examen macroscopique et microscopique.....	45
1.1.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques.....	47

1.2. Caractérisation moléculaire	51
1.2.1. Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA	51
1.2.2. Phylogénie des lactobacilles pré-identifiés	55
1.3. Caractérisation technologique.....	58
1.3.1. Production d'arômes.....	58
1.3.2. Recherche et quantification des EPS.....	58
1.3.3. Lipolyse	60
1.3.4. Mise en évidence de la protéolyse.....	60
1.3.4.1. Sur milieu MRS au lait.....	61
1.3.4.2. Dans les surnageants des cultures.....	61
1.3.5. Mise en évidence de la relation entre le pouvoir acidifiant et la production des protéases	63
<i>Conclusion de la première partie</i>	66
2. Mise en évidence, <i>in vitro</i>, de quelques propriétés probiotiques.....	67
2.1. Aspect sécuritaire	68
2.2. Résistance à l'acidité et aux sels biliaires	69
2.3. Test d'hydrophobicité	72
2.4. Activité antibactérienne	74
<i>Conclusion de la deuxième partie</i>	77
Conclusion générale et perspectives	79
Références bibliographiques	82

Introduction générale

La flore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, a été sollicitée pour ses aptitudes acidifiantes et son implication dans la formation du goût, des arômes et de la texture de nombreux produits laitiers dont les fromages (Tormo, 2010). Au-delà des technologies fromagères, les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfel, 1997), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut « Generally Recognized As Safe », excepté pour les entérocoques (Klaenhammer et *al.*, 2005).

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans les équilibres microbiens du lait. Elles constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (Caridi et *al.*, 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutéline, du diacétyle et des bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques morphologiques et physiologiques qui se traduit par des utilisations multiples (Zambunelli et *al.*, 2002). Les bactéries lactiques présentent un caractère déterminant pour leur utilisation, un important polymorphisme, qui se traduit par l'existence au sein des espèces de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes, et par l'instabilité des souches elles-mêmes. Cette variabilité, due à une organisation particulière du matériel génétique des bactéries lactiques, accroît la gamme des utilisations ; mais aussi les risques d'instabilité technologique (François et *al.*, 2007). L'utilisation maîtrisée de ces bactéries dans l'industrie nécessite une préalable connaissance de leurs principaux processus métaboliques, de leurs interactions avec les autres microorganismes et de leurs mécanismes de défense (Zadi Karam, 1998).

La caractérisation des bactéries lactiques a favorisé le développement de souches bactériennes définies, connues sous le nom de levains ou de cultures starters. Elles remplacent de plus en plus les mélanges non définis traditionnellement employés en industrie laitière (Fitzsimmons et *al.*, 1999). Les ferments lactiques jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitière et la recherche de nouvelles souches possédant des activités

biologiques particulières sont en pleine expansion dans le secteur de l'industrie laitière (Brillet et *al.*, 2005; Drici et *al.*, 2009; Boumehira et *al.*, 2011).

Dans la fabrication fromagère, les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits (Lee et *al.*, 2006). Leur action est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme : la production d'acide lactique et l'activité protéolytique (Desmazeaud, 1998). L'utilisation industrielle de starters composés de bactéries autochtones semble être une voie plus prometteuse, peu étudiée (Fall, 2011). Le lait cru et le lait fermenté traditionnel sont riches en souches de bactéries lactiques avec de nouvelles propriétés (Wouters et *al.*, 2002). Le criblage et la caractérisation de cette microflore est très intéressant pour isoler de nouvelles souches avec des fonctions technologiques potentiellement applicables dans l'industrie alimentaire (El-Ghaich et *al.*, 2010).

Les bactéries lactiques possèdent également d'autres capacités bénéfiques et sont largement connues pour leur potentiel probiotique et nutritionnel. Elles peuvent par conséquent avoir des effets bénéfiques sur la santé en contribuant à la protection contre certaines maladies ou à prévenir certaines carences nutritionnelles (Turpin, 2011). En outre, pour être sélectionnées, les souches probiotiques doivent surmonter certaines barrières et d'exécuter certaines fonctions, y compris, par exemple, la résistance aux conditions gastro-intestinales telles que l'acidité gastrique et la toxicité de la bile, la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte, l'activité antimicrobienne contre les agents pathogènes et la possession d'un effet de promotion de la santé sur l'hôte (Dunne et *al.*, 2001; FAO / OMS, 2001). Les souches probiotiques doivent également avoir de bonnes propriétés technologiques (Parvez et *al.*, 2006).

A cette occasion, le premier objectif de ce travail de thèse est de mettre en place une collection de souches locales de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru des populations locales de vache et de chèvre de la région de Ain Defla, Algérie, et d'apprécier, dans une moindre mesure, la diversité de ces espèces. Cette collecte lactique est étudiée par différentes techniques d'identification phénotypique et moléculaire, par le séquençage partiel de l'ADNr 16S, puis caractérisée pour certaines activités d'intérêts technologiques. Le second objectif de ce travail est la caractérisation fonctionnelle afin d'évaluer leur profil probiotique, *in vitro*.

Les critères que nous avons retenus, tant pour le criblage sont : l'étude de leur aspect sécuritaire, l'activité hémolytique et la résistance aux antibiotiques, la tolérance aux sels biliaires (0,3%), la résistance à l'acidité gastrique, l'hydrophobicité de la surface cellulaire des souches vis-à-vis du xylène et de l'activité antibactérienne.

Ce présent travail répond à la nécessité d'enrichir le patrimoine national en microflore lactique autochtone.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Lait cru

1.1. Qualité nutritionnelle

La vache assure de loin la plus grande part de la production mondiale du lait (90%), même en pays tropicaux (70%) (FAO, 1998). Ce lait est de tous le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes. Il est logiquement aussi le produit laitier le plus consommé et étudié en nutrition humaine. C'est une boisson saine puisque sa consommation est associée à une alimentation de qualité. Il fournit une matrice facilement accessible, riche en une grande variété de nutriments essentiels: des minéraux, des vitamines et des protéines faciles à digérer. Il est par conséquent essentiel à l'ensemble des fonctions du corps (Steijns, 2008). Avec les céréales, les viandes, les légumes et les fruits, les produits laitiers sont considérés comme des aliments riches en nutriments, ils fournissent de nombreux éléments nutritifs à teneur relativement faible en énergie et indispensables à la santé tout au long du cycle de vie (Drewnowski, 2005; Miller et *al.*, 2007).

Le lait et les produits laitiers ont également servi de vecteurs d'ingrédients alimentaires fonctionnels (phytostérols, les acides gras et différentes sortes de bactéries probiotiques) et de source riche pour le développement d'une grande variété d'ingrédients novateurs de promotion de la santé qui trouvent leur voie sur le marché (suppléments diététiques) (Schaafsma et Steijns, 2000; Steijns et Van Hooydonk, 2000; Steijns, 2001a, 2003; Michaelidou et Steijns, 2006; Steijns, 2008). Enfin, les protéines lactières sont préférentiellement introduites dans des formules de nutrition spéciales comme la (re) construction des tissus et la masse musculaire chez les nourrissons, les personnes hospitalisées, les athlètes, et les personnes âgées (Steijns, 2001b).

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants: eau, protéines, lactose, matières grasses et minérales. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre (Courtet Leymarios, 2010).

1.2. Composition du lait

Fredot, (2006) rappelle que le lait d'une manière générale se divise en quatre phases :

- une phase aqueuse contenant le lactose, les composants minéraux solubles, les protéines sériques, l'azote non protéique et la fraction soluble de la caséine ;

- une phase micellaire ou colloïdale contenant la plus grande part de la caséine (protéine coagulable) et la fraction insoluble des composants minéraux ;

- la troisième phase comprend des éléments en suspension tels que les globules gras, les leucocytes et les cellules microbiennes ;

Et enfin une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représente environ 5% du volume du lait.

La composition des différents laits d'animaux varie considérablement d'une espèce à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce, voire à l'intérieur des types ou des races d'espèces identiques. Cette variabilité peut dépendre de la race, de la nutrition, du stade de lactation, de l'âge, de l'époque de l'année et du débit lacté (Courtet Leymarios, 2010) (tableau 1).

Tableau 1: Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces (g/L) (Alves de Oliveira, 2007).

	Matière sèche	Matière protéique	Lipides (MG)	Lactose	Cendres (MM)	Calcium (Ca)	Phosphore (P)
Vache	132	35	38	50	7.2	1.25	0.95
Chèvre	115	34	35	45	8	1.35	1
Brebis	185	60	70	45	8.7	1.9	1.5
Buffle	174	38	77	48	7.8	1.8	1.8
Jument	105	25	16	61	4.5	1	0.6
Femme	120	13	39	70	2	0.3	0.15

2. Diversité et rôle de la microflore des laits crus

Il existe peu de travaux récents consacrés à un inventaire de la diversité microbienne des laits crus. Le peu de données publiées portent sur le lait de vache et secondairement celui de la chèvre (Tormo, 2010) (tableaux 2, 3 et 4).

Les microorganismes du lait cru sont souvent abordés sous l'angle technologique. En effet, ils jouent un rôle non négligeable en transformation fromagère du lait cru et sont communément classés en microflore d'intérêt technologique, microflore d'altération, et microflore potentiellement pathogène (Richard, 1983). Les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont les plus fréquemment rencontrés dans les laits crus.

Tableau 2 : Biodiversité spécifique des bactéries lactiques dans des laits crus de vache, chèvre, brebis d'après : (1) Bouton et *al.*, (2006); Dalmasso et *al.*, (2008); Rasolofo et *al.*, (2010); (2) Badis et *al.*, (2004); Callon et *al.*, (2007); (3) Caridi et *al.*, (2003); Feutry et *al.*, (2010).

Espèces	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait de Brebis
	(1)	(2)	(3)
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	+	+	+
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>			
<i>Lactococcus garviae</i>	+	+	
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+
<i>En. durans</i>	+	+	
<i>En. faecium</i>	+	+	
<i>En. hirae</i>			+
<i>En. saccharominimus</i>	+		
<i>Lb. plantarum</i>	+	+	+
<i>Lb. paraplantarum</i>	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i>	+		
<i>Lb. helveticus</i>	+	+	
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	+		
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>		+	
<i>Lb. brevis</i>		+	+
<i>Lb. casei</i>		+	
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>			+
<i>Lb. animalis</i>			
<i>Lb. curvatus</i>	+		+
<i>Ln. mesenteroides</i>	+	+	+
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	+		+
<i>Ln. lactis</i>	+		
<i>Ln. citreum</i>	+		

Tableau 3: Les souches lactiques de la race Kabyle (Badis et *al.*, 2005).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Ln. lactis</i>	<i>Weissella</i> <i>para-</i> <i>mesenteroides</i>	<i>P.damnosus</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Lc.</i> subsp. <i>hordniae</i>	<i>Ln.</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>		
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>			
<i>Lb. brevis</i>		<i>Lc. plantarum</i>			
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>		<i>Lc. graviae</i>			
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Ln. lactis</i>	<i>Weissella</i> <i>para-</i> <i>mesenteroides</i>	<i>P.damnosus</i>

Tableau 4: Les souches lactiques de la race Arabia (Badis et al., 2005).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	<i>Ln. lactis</i>	<i>Weissella para-mesenteroides</i>	<i>P.damnosus</i>
<i>Lb.plantarum</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Ln.pseudo-mesenteroides</i>		<i>P.acidilactici</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Ln.mesenteroides</i> subsp. <i>dextrancum</i>		<i>P.parvulus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>Lc. plantarum</i>			
<i>Lb. brevis</i>					
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>			<i>Ln. lactis</i>	<i>Weissella para-mesenteroides</i>	<i>P.damnosus</i>
<i>Lb.acidophilus</i>					
<i>Lb.animalis</i>					
<i>Lb.amylophilus</i>					

3. Races bovines et caprines locales

En Algérie, l'élevage ovin prédomine, il représente 80% du total des effectifs suivi par les caprins 13%, puis l'élevage bovin qui représente seulement 6% de l'effectif globale dont 58% des vaches laitières (Nedjraoui, 2003). Le cheptel des races locales représente 48% des effectifs nationaux et n'assure que 20% de la production du lait de la vache (Bencharif, 2001).

Le bovin local appartiendrait à un seul et même groupe dénommé Brune de l'Atlas, se trouve dans les zones montagneuses et le nord de l'Algérie. Comparativement aux races importées, les races locales sont caractérisées par l'adaptation aux conditions difficiles du milieu. En effet, elles sont adaptées à la marche en terrains difficiles, aux variations des régimes alimentaires, la résistance à la sous-alimentation et aux maladies (Yakhlef, 1989; Eddebarh, 1989).

Les populations qui composent la Brune de l'Atlas se différencient nettement du point de vue phénotypique. On distingue principalement (Feliachi, 2003):

- **La Guelmoise** à pelage gris foncé, vivant en zones forestières. Elle a été identifiée dans les régions de Guelma et de Jijel, cette population compose la majorité de l'effectif ;

-**La Cheurfa** à pelage gris clair presque blanchâtre, vit en bordure des forêts et se rencontre dans les régions de Jijel et de Guelma ;

- **La Setifienne** à robe noirâtre uniforme, elle présente une bonne conformation. Sa taille et son poids varient selon la région où elle vit. La queue est de couleur noire, longue et traîne parfois sur le sol. La ligne marron du dos caractérise cette population.

-**La Chelifienne** se caractérise par une robe fauve, une tête courte, des cornes en crochets, des orbites saillantes entourées de lunettes ‘marron foncé’ et une longue queue noire qui touche le sol.

Il existe d’autres populations mais avec des effectifs plus réduits telles que :

- **La Djerba** qui peuple la région de Biskra et qui se caractérise par une robe brune foncée, une tête étroite, une croupe arrondie et une longue queue. La taille très réduite, adapté aux milieux très difficiles du Sud.

- **La Kabyle et la Chaouia** qui dérivent respectivement de la Guelmoise et de la Cheurfa.

Le cheptel caprin algérien est peu connu, sa conformation et ses aptitudes ne sont pas définies. Il existe (Feliachi, 2003) :

- **Race Arabia** : Race domestique localisée dans la région de Laghouat. Elle se subdivise en deux sous-types: l’un sédentaire et l’autre transhumant. Comparativement au type transhumant, le type sédentaire a les poils plus longs 14-21 cm contre 10-17 cm pour le type transhumant.

- **Race Makatia**: Cette race est localisée dans les hauts plateaux et la région Nord de l’Algérie. Elle est utilisée principalement pour la production de lait et de viande et spécialement pour la peau et le cuir. C’est une race de grande taille et de couleur variée.

- **Race Kabyle**: La chèvre de Kabylie est petite de taille. Elle peuple abondamment les massifs montagneux de la Kabylie, des Aurès et du Dahra. Son poil est long de couleur généralement brun foncé, parfois noir; la tête de profil courbé, est surmontée de cornes.

- **Race M’zabit**: Chèvre principalement laitière, appelée également Touggourt, cette chèvre est originaire de M’tlili dans la région de Ghardaïa. Elle peut toutefois se trouver dans toute la partie septentrionale du Sahara. Cette race représente 22,5% du total des chèvres dans le pays.

L'animal est de taille moyenne (65 cm), son corps allongé, droit et rectiligne. Sa tête est fine et cornée, alors que sa robe présente trois couleurs: le chamois dominant, le blanc et le noir.

4. Bactéries Lactiques

4.1. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la première fois par Orla –Jensen en 1919, réunit plusieurs genres de différentes morphologies ayant pour caractère commun leur capacité à fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique (Novel, 1993).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 4,5. Ces bactéries sont généralement immobiles. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres: *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus* (Salminen et al., 2004; Köning et Fröhlich, 2009; Pringsulaka et al., 2011).

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

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

4.2. Taxonomie

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell (Colwell, 1970) et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées.

- Parmi elles, figure en premier la classification par des méthodes phénotypiques qui incluent la croissance à différentes températures, la tolérance au NaCl, aux acides, à la bile ou à d'autres inhibiteurs, le type fermentaire, l'hydrolyse de l'arginine et de l'esculine, l'isomère optique de l'acide lactique, le profil des fermentations des sucres et la production d'exopolysaccharide (Gevers, 2002; Temmerman et al., 2004)(tableau 5). Ces méthodes se sont ensuite étendues par l'étude des marqueurs chimiotaxonomiques comme la composition de la paroi cellulaire bactérienne (De Ambrosini et al., 1996; Krieg, 2001; Köning et Fröhlich, 2009), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) qui la composent (Gilarová et al., 1994).
- Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit trois groupes (McLeod et al., 2008): Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*. Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales.

Tableau 5: Quelques caractéristiques des bactéries lactiques (Von Wright et Axelsson, 2012).

Famille	Genre	forme	Caractéristiques							
			CO ₂ de glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6,5% NaCl	Croissance à 18% NaCl	Croissance à pH 4,4	Croissance à pH 9,6	Type d'acide lactique
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocci (Tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	- ^c	+	-	ND ^d	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocci (Tétrades)	-	+	-	+	+	-	+	L
	<i>Vagococcus</i>	Cocci (Tétrades)	-	+	-	-	-	V	-	L
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	V	V	V	V	-	V	-	D, L, DL ^e
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Pediococcus</i>	Cocci (Tétrades)	-	V	V	V	-	+	-	L, DL ^e
	<i>Leuconostoc</i>	Cocci ^a	+	+	-	V	-	V	-	D
	<i>Oenococcus</i>	Cocci	+	+	-	V	-	V	-	D
	<i>Weissella</i>	Cocci/Bacilles ^b	+	+	-	V	-	V	-	D, DL ^e
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> ^d	Cocci	-	+	-	-	-	V	-	L
	<i>Streptococcus</i>	Cocci	-	-	V	-	-	-	-	L

V, Variable ; ND, non déterminé ; a, dans l'ancienne littérature les lactocoques sont référées aux Streptocoques group N ; b, cocci ou bacilles ; c, faible quantité de CO₂ selon le milieu ; d, absence de croissance à 8% NaCl ; e, production d'acide lactique D, L ou DL est variable selon l'espèce.

Les études d'hybridation ADN-ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (Makela et al., 1992; Vandamme et al., 1996; Woese et al., 1990). L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen et al., 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (2009) les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (figure 1).

Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.

Il faut signaler que le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments mais il est phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières (Vandamme et al., 1996; Gevers, 2002; Patrignani et al., 2006).

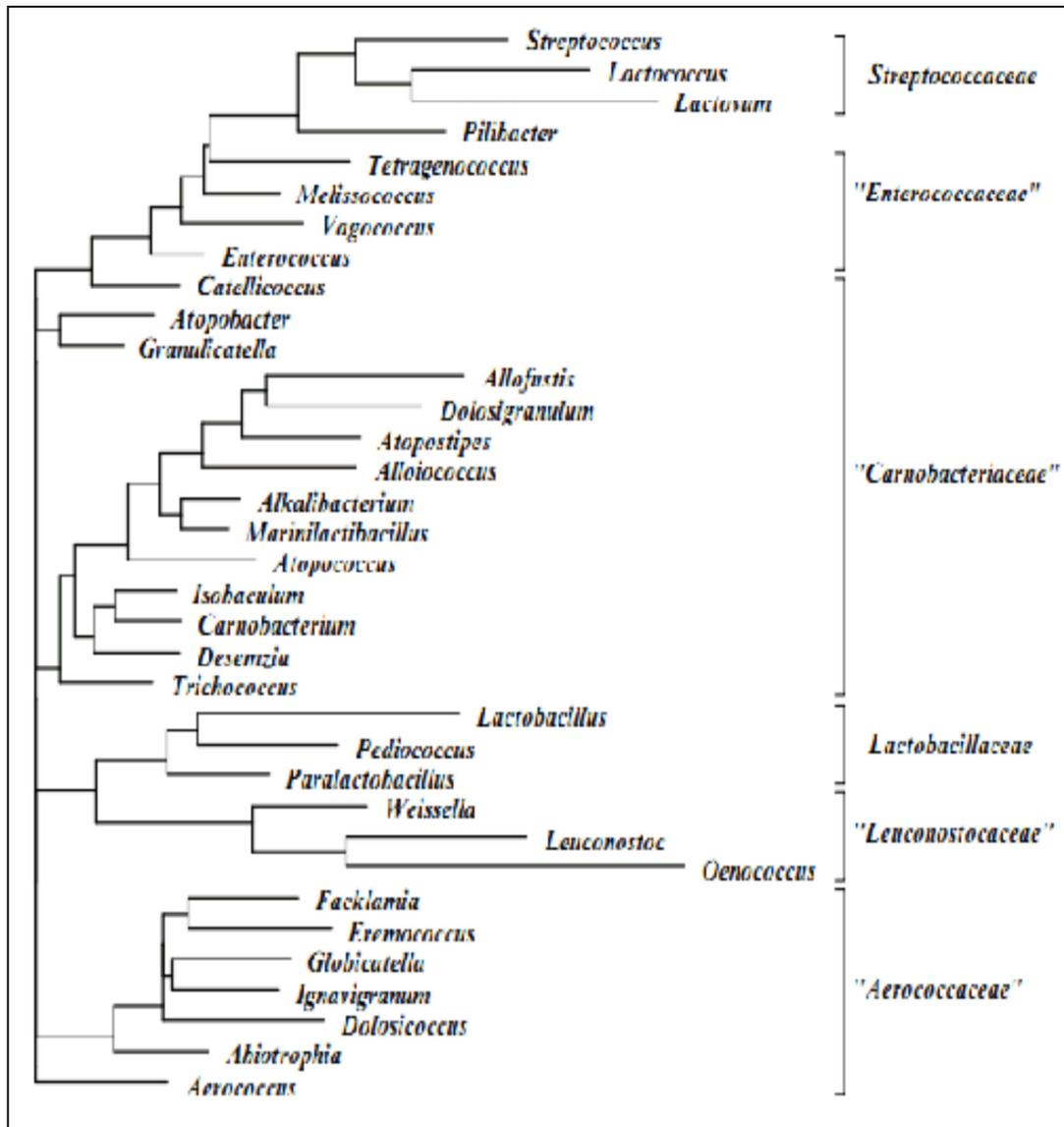


Figure 1 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *Bacilli* » (De Vos et al., 2009).

4.3. Identification moléculaire

Le gène ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S (ARN ribosomal 16S) est l'un des gènes les mieux conservés chez les organismes procaryotes. Aussi, cet élément est reconnu par la communauté scientifique pour être une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles (Zakhia et de Lajudie, 2006). En effet, l'ADNr 16S :

- comporte des séquences internes très conservées qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification de l'ADNr 16S de la majorité des bactéries existantes;
- comportent des séquences internes variables qui permettent de distinguer les espèces de bactéries entre-elles;

L'autre atout est que la taille de l'ADNr 16S est suffisamment courte (partielle: ≈ 500 nucléotides ou complète: ≈ 1500 nucléotides) pour être analysé rapidement.

À cause de leur distribution universelle, les séquences du domaine variable sont idéales pour les inférences évolutives globales (Gray, 1984). Les régions hautement conservées constituent une bonne référence pour la construction des amorces universelles qui peuvent être utilisées pour le séquençage à la fois de l'ARNr ou ADNr de plusieurs espèces et l'amplification des régions par PCR ou comme sondes pour l'analyse des sites de restriction (Hillis et Dixon, 1991). Il est constitué de sept régions conservées et de neuf régions hypervariables (Chakravorty *et al.*, 2007) (figure 2). Un pourcentage supérieur à 97 % entre la séquence d'ARNr 16S étudiée et celles contenues dans les banques des données permet de définir l'espèce bactérienne (Goebel et Stackebrandt, 1994).

De plus, des études minutieuses de régions conservées ont montré qu'il existait des séquences caractéristiques de grands groupes de bactéries. Ces séquences sont appelées "séquences signatures" et permettent d'établir des relations entre des organismes phylogéniquement distants (Woese *et al.*, 1985). Des catalogues d'oligonucléotides ont été obtenus pour de nombreuses souches bactériennes. Il existe une base de données sur Internet qui contient des séquences des ARNr. On peut, à ce propos consulter le projet RDP (Ribosomal Database Project) qui propose une collection d'au moins 100 000 séquences, en plus des informations phylogénétiques, de références bibliographiques et des séquences nouvellement établies (Madigan et Martinko, 2007).

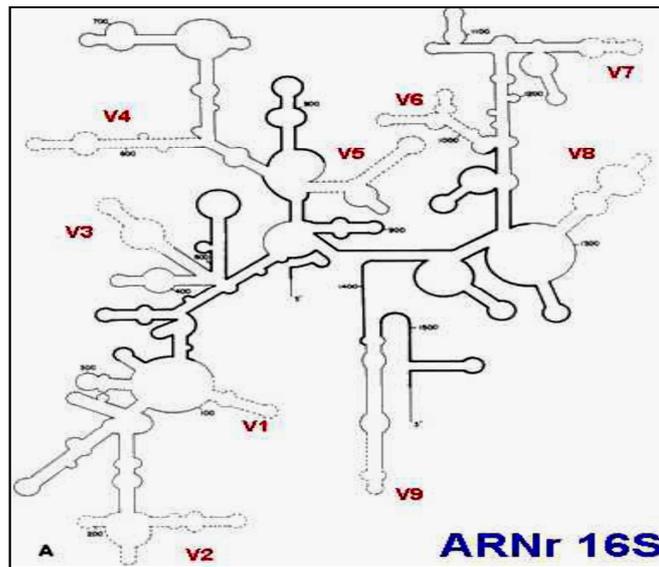


Figure 2: Modèle de structure secondaire de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique des procaryotes. Les dénominations "V" correspondent aux régions variables. (Tiré des travaux de Pace et Burpin, 1990).

Dans certain cas l'analyse des séquences de la région entre les gènes 16S et 23S (Intergenic Spacer Region ITS) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARN 16S lui-même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. pseudopantarum* ou *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* peuvent être discriminées (Berthier et Ehrlich, 1998; Tannock et al., 1999).

Généralement on considère que deux isolats bactériens appartiennent à des espèces différentes si la différence de leur contenu G+C est supérieure à 5 %. Toutefois, deux souches ayant le même G+C n'appartiennent pas forcément à la même espèce, car cette valeur ne prend pas en considération l'arrangement linéaire des nucléotides dans la molécule d'ADN. La présence des génomes complètement séquencés pour l'ensemble des principales familles des *Lactobacillales* a permis la construction d'arbres phylogénétiques dont le degré de résolution et de robustesse sont élevés (Makarova et al., 2006). Le génome des bactéries lactiques est de taille variable entre 1600 à 3000 gènes, ceci indique une hétérogénéité élevée dans le taux d'évolution génomique, qui peut être due à la duplication, acquisition ou la perte des gènes, ce qui signifie aussi une diversité génétique (Makarova et Koonin, 2007). *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum* ont un génome de 3,4Mb.

Actuellement le séquençage du génome total de vingt bactéries lactiques est disponible parmi lesquelles: *Oenococcus oeni*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Pc. pentosaceus* et *Ln. mesenteroides*. Les bactéries lactiques possèdent à la fois des plasmides circulaires et linéaires qui codent pour différentes fonctions: fermentation des sucres, activité protéolytique, production de bactériocines, résistance aux antibiotiques et aux phages (Köning et Fröhlich, 2009). Donc, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Lahtinene et al., 2012).

4.4. Présentation des principaux genres utilisés dans ce travail

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Aguirre et Collins, 1993; Adams et Marteau, 1995; De Vos et al., 2009; Zhang et Cai, 2014).

4.4.1. *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (Desmazeaud, 1992). Il compte actuellement 158 espèces et sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (Zhang et Cai, 2014). Les lactobacilles sont souvent associés au tractus gastro-intestinal des mammifères ainsi qu'aux végétaux. Beaucoup d'espèces sont utilisées en tant que probiotiques pour la santé animale ou humaine.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53°C, avec un optimum entre 30 et 40°C (De Vos et al., 2009). Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum de 5,5 à 6,2 (Zhang et Cai, 2014).

À l'origine, les espèces du genre *Lactobacillus* ont été regroupées en fonction de leur température de croissance et leur capacité à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de potentiel homo ou hétéro fermentaire.

Orla-Jensen, (1919) a subdivisé ce groupe d'une manière similaire à celle des coques lactiques (*Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*). Cette division est toujours valide à un degré considérable. Hammes et Vogel, (1995) ont divisé le genre en trois sous

genres sur la base des fermentés et le processus de fermentation utilisée (Salminen et al., 2004; Zhang et Cai, 2014):

Groupe I: comprend les lactobacilles homofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre "*Thermobacterium*" ne produisant presque exclusivement que l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses par glycolyse. Ils ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates ;

Groupe II: comprend les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre "*Streptobacterium*" et qui fermentent les hexoses en acide lactique par glycolyse, et peuvent fermenter les pentoses en acide lactique et en acide acétique grâce à une phosphocetolase inductible. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.

Groupe III: ce sont des lactobacilles hétérofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre "*Betabacterium*" qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO₂ et qui fermentent les pentoses en acide lactique et acide acétique).

4.4.2. *Leuconostoc*

La première espèce décrite était *Leuconostoc mesenteroides* par Tsenkovskii, (1878). Actuellement le genre *Leuconostoc* comprend 13 espèces (Zhang et Cai, 2014) qui sont : *Ln.mesenteroides*, *Ln.carnosum*, *Ln.citreum*, *Ln. fallax*, *Ln.gasicomitatum*, *Ln.gelidum*, *Ln.inhae*, *Ln.kimchii*, *Ln.lactis*, *Ln.holzapeflii* ; *Ln.palmae*, *Ln.miyukkimchi* et *Ln.pseudomesenteroides*. *Leuconostoc mesenteroides* est la bactérie épiphyte la plus abondante à la surface des fruits et des végétaux, et est également retrouvée dans divers produits laitiers. *Leuconostoc* produit notamment du diacétyle à partir du citrate (Drider et Prévost, 2009).

Elles sont exigeantes de point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Leur optimum de croissance est de 20 - 30°C (Bjorkroth et al., 2009).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont semblables aux lactobacilles hétérofermentaires et sont souvent isolées du même habitat et partagent de nombreuses caractéristiques (Zhang et Cai, 2014).

4.4.3. *Streptococcus*

Streptococcus thermophilus est la seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire. Il se différencie des autres streptocoques par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène, la résistance à la température (Pilet et al., 2005).

Streptococcus thermophilus est l'une des bactéries lactiques thermophiles, largement employée en tant que levain dans la fabrication des produits laitiers fermentés tel que le yaourt et les fromages à pâtes cuites (Hols et al., 2005; Delorme, 2008). Elle est connue par une forte production d'arôme tel que l'acétaldéhyde et par sa capacité de produire de l'acide folique et des exopolysaccharides (Delorme, 2008).

4.4.4. *Pediococcus*

Ce sont des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés, dont la particularité et le regroupement en tétrade dû à une division dans les deux directions perpendiculaires (Pilet et al., 2005). Les espèces de ce genre sont mésophiles, homofermentaires et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance (Holzapfel et al., 2009). Actuellement, ce genre comprend 11 espèces : *Pc. acidilactici*, *Pc. argentinicus*, *Pc. cellicola*, *Pc. claussenii*, *Pc. damnosus*, *Pc. ethanolidurans*, *Pc. inopinatus*, *Pc. parvulus*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. siamensis* et *Pc. stilesii* (Zhang et Cai, 2014).

Pc. acidilactici et *Pc. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ceci a conduit à de nombreuses sélections de souches et leur utilisation comme agents antibactériens ou probiotiques dans la fabrication des produits carnés (Albano et al., 2007; Ruiz-Moyano et al., 2008). Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez et al., 2007).

4.4.5. *Lactococcus*

Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005). La première espèce de *Lactococcus* décrite fut *Bacterium lactis* par Lister, (1873). Elle fut ensuite renommée *Lactococcus lactis* par Schleifer et al. (1985). Le genre *Lactococcus* comprend 11 espèces et sous espèces reconnues : *Lc. changangensis*, *Lc. fujiensis*, *Lc. garvieae*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *tractae*,

Lc.piscium, *Lc.plantarum*, *Lc.raffinolactis* et *Lc. taiwanensis* (Zhang et Cai, 2014). Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bacteriocines (Tamime, 2002).

5. Propriétés métaboliques recherchées chez les bactéries lactiques

Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires.

Elles sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain. Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisque il permet la formation du caillé. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et *al.*, 2008):

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire;
- le catabolisme intracellulaire du sucre;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) ou la voie bifide (figure 3) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

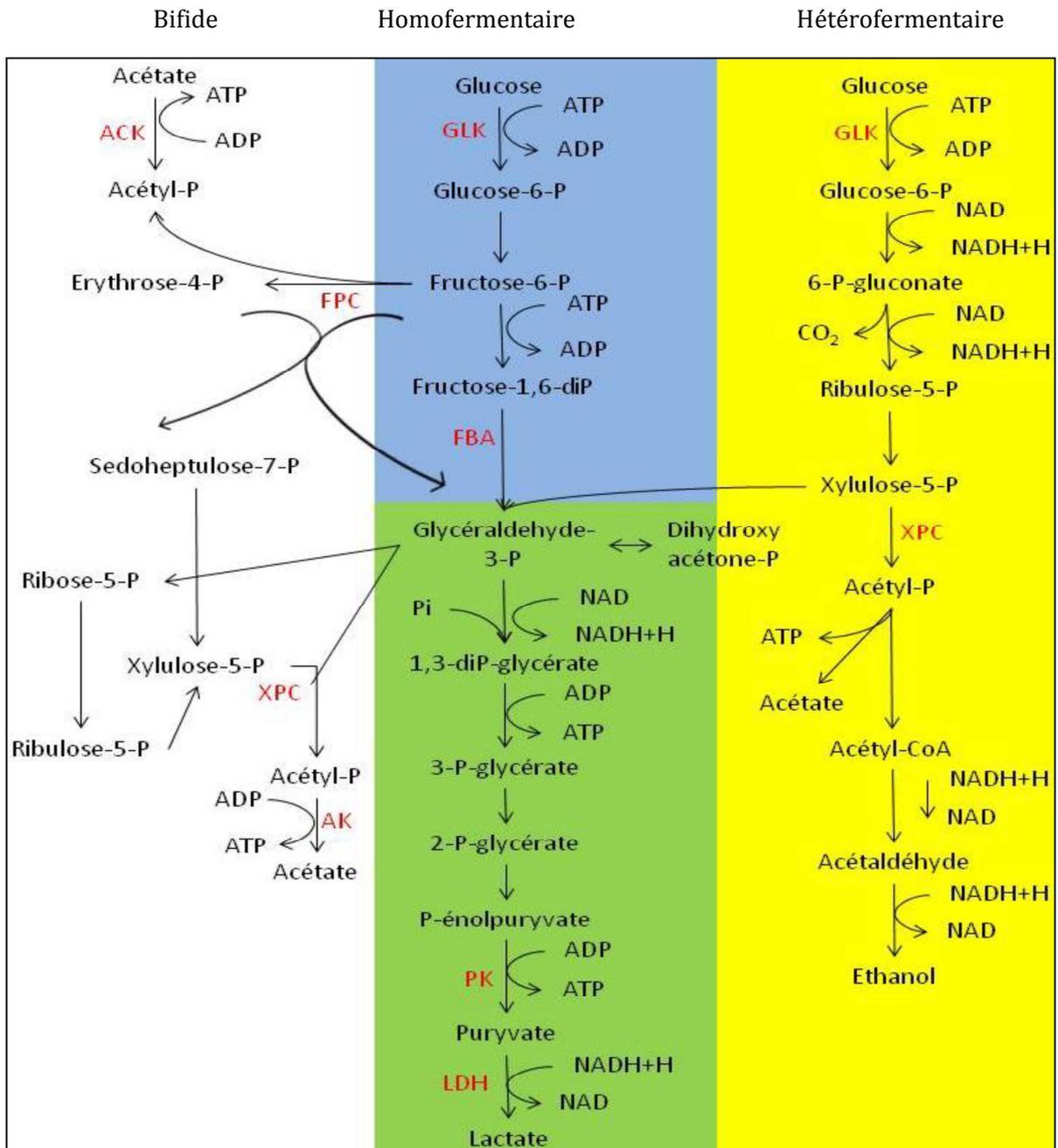


Figure 3: Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose. (Les principales enzymes sont indiquées en rouge. GLK : glucokinase, FBA : FBP aldoolase, FCP : fructose-6-phosphate phosphocétolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ACK : acétate kinase).

Les bactéries lactiques participent également à la texture et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présents dans le lait (lactose, citrate...), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses et grâce à leurs propriétés d'acidification et de production de polysaccharides (figure 4).

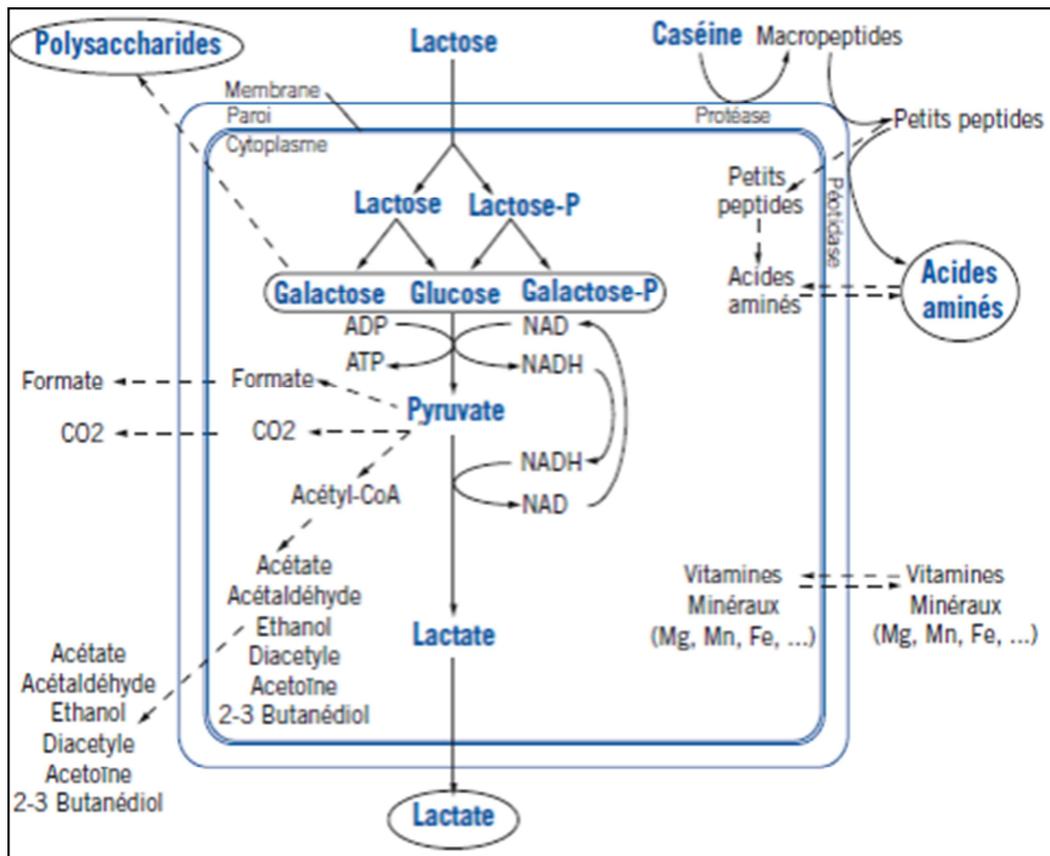


Figure 4 : Principales voies métaboliques des bactéries lactiques (Thompson et Gentry Weeks, 1994).

Elles sont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ ou améliorer la fermentation de nombreux aliments. Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bio-conservateur est leur production de molécules antimicrobiennes (Settanni et Corsetti, 2008). Leur pouvoir antimicrobien envers de nombreuses autres bactéries est lié à leur capacité à produire différents acides et métabolites tels que les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, des peptides antimicrobiens, du diacétyle et du dioxyde de carbone ainsi que des exopolysaccharides (Fuller et Gibson, 1997). Les exopolysaccharides des bactéries lactiques sont connus pour avoir des propriétés bénéfiques sur la santé humaine incluant l'abaissement du cholestérol, des propriétés anti-ulcère (dextrane-sulfane), anti-tumorale, immunomodulante ou anti-inflammatoire (Lapointe, 2009). De plus, ils peuvent agir comme des fibres alimentaires pouvant favoriser la croissance et la survie des bactéries probiotiques dans le tractus gastro-intestinal (German *et al.*, 1999). En biopréservation, des effets synergiques ont pu être observés entre bactériocines ou entre

bactériocines et d'autres composés antimicrobiens (Yoon et al., 2011; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010; Garcia et al., 2010).

De nos jours, les bactéries lactiques font l'objet de recherches intensives qui sont améliorées par la disponibilité de la séquence complète du génome de nombreuses bactéries lactiques: *Lactococcus lactis* IL1403 (Bolotin et al., 2001), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezem et al., 2003), *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Pridmore et al., 2004), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann et al., 2005).

Les technologies laitières constituent le secteur principal d'application des bactéries lactiques. La compréhension de la physiologie de ces microorganismes contribue ainsi à un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés.

Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes (Ferain et al., 1996; Hols et al., 1999; Hugenholtz et al., 2000), de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait.

Les bactéries lactiques sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que «probiotiques» (Leveau et Bouix, 1993; Patrignani et al., 2006; Steijns, 2008). Il s'agit de micro-organismes vivants qui une fois ingérés, vont conférer un effet physiologique bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/OMS, 2002). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991; Gordin et Gorbach, 1992). D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*.

Les principaux effets prouvés des probiotiques sont la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction des intensités des épisodes diarrhéiques, ainsi que la réduction de l'intolérance au lactose. Les lactobacilles ont également d'autres effets bénéfiques moins bien étudiés comme la synthèse de vitamines B, l'amélioration de l'absorption de nutriments, la dégradation de facteurs antinutritionnels, la modulation de la

physiologie du système digestif, et récemment la diminution de la perception de la douleur (Turpin et *al.*, 2010). Ces capacités peuvent donc être bénéfiques pour la santé et peuvent participer à la protection contre de nombreuses pathologies.

De par sa définition, pour qu'un microorganisme soit reconnu comme probiotique, il faut que son effet bénéfique chez l'Homme, et sa capacité à survivre au transit intestinal soient démontrés (WHO/FAO, 2001; Van de Guchte et *al.*, 2002; AFSSA, 2005; EFSA, 2010). Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L'adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestif leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l'hôte, mais permet également l'exclusion des pathogènes et une immunostimulation (Servin, 2004). C'est pourquoi cette capacité est très recherchée chez les probiotiques (Kravstov et *al.*, 2008) (figure 5).

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation.

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saraela et *al.* (2000), ces critères sont de bonnes propriétés sensorielles, une résistance aux phages, une viabilité durant le traitement technologique et une stabilité dans le produit et durant le stockage. Cependant, l'aptitude de ces souches à être industrialisées n'est souvent vérifiée qu'après leur sélection sur les critères de fonctionnalité; mais les souches les plus fonctionnelles ne sont pas forcément des souches industrialisables. Les études présentant à la fois l'aptitude des souches à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal et aux conditions des procédés de fabrication sont également assez rares.

Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques. Ainsi, la capacité de survie des probiotiques dans l'hôte après leur ingestion, dépend de leur résistance intrinsèque, des facteurs de l'hôte et du véhicule par lequel ils ont été ingérés (Marteau et Shanahan, 2003).

Parmi les facteurs de l'hôte qui réduisent la survie des probiotiques, on cite principalement l'acide gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les autres sécrétions digestives (mucus, défensines) et l'interaction avec la flore endogène (Godward et al., 2000; Marteau et Shanahan, 2003).

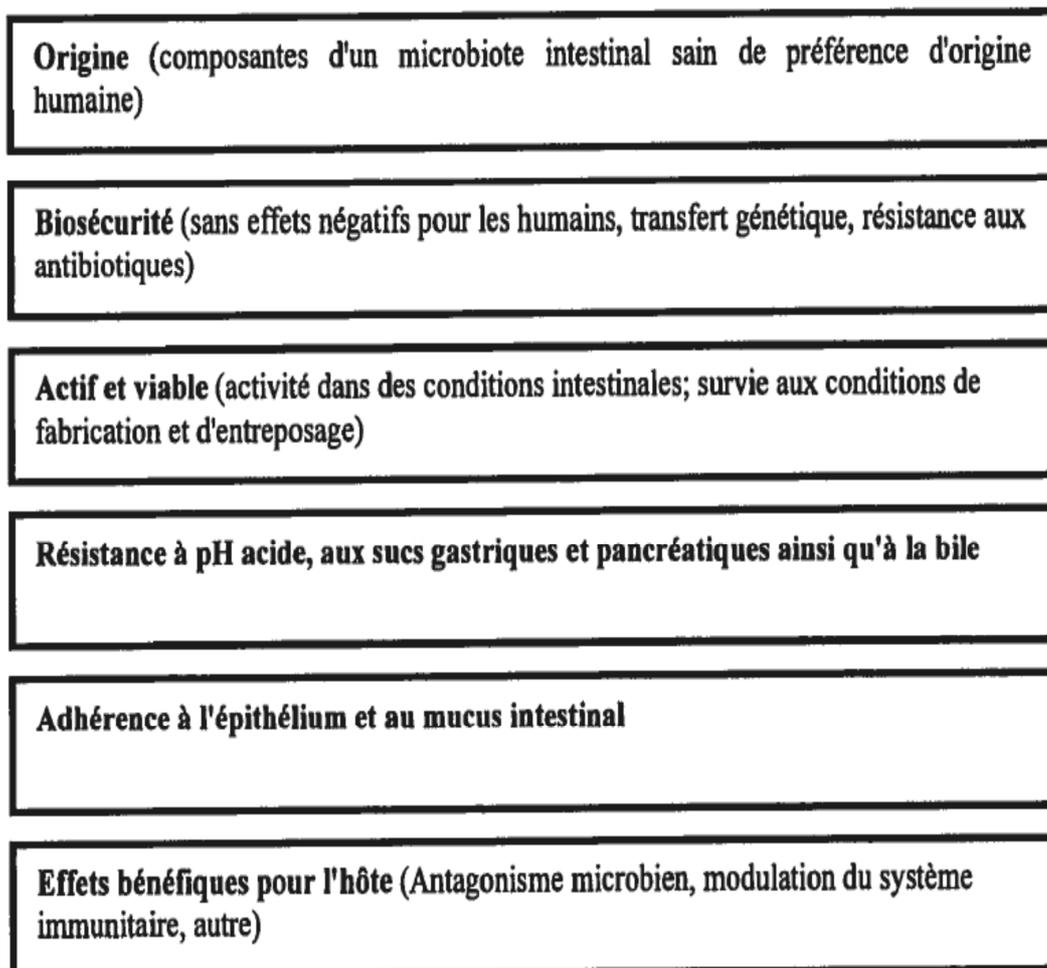


Figure 5: Critères de sélection des probiotiques (Milette, 2007).

6. Croissance des bactéries lactiques dans le lait et Protéolyse

Les bactéries lactiques se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes, outre la présence d'une source fermentescible, elles ont besoin pour croître de plusieurs acides aminés qu'elles ne peuvent pas synthétiser à partir d'une source azotée simple (De Roissart et Luquet, 1994). Parmi les bactéries lactiques, les leuconostocs et les lactobacilles sont connus pour leurs exigences multiples en acides aminés, vitamines, des bases purines et pyrimidines (Hebert et al., 2000).

Le lait cru tel qu'il sort de la mamelle n'est pas un milieu de culture optimal pour les bactéries lactiques. Quelle que soit son origine, il contient toujours un excès de sucres fermentescibles nécessaire aux bactéries pour atteindre une densité cellulaire de 10^9 cellules/mL, par contre, il est pauvre en nutriments azotés assimilables (Luquet, 1986). La teneur en acides aminés libres et en peptides est insuffisante pour une croissance optimale de ces bactéries (Barrette, 2000).

L'azote aminé disponible dans le lait existe sous forme de protéines (caséines et protéines du lactosérum) et de composés de bas poids moléculaire (acides aminés et peptides). Ces derniers sont beaucoup moins abondants que les protéines et leurs teneurs sont faibles (De Roissart et Luquet, 1994). La caséine constitue 80 % des protéines du lait, elle est composée de quatre phosphoprotéines: les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ qui contiennent tous les acides aminés nécessaires pour la croissance des bactéries lactiques (Kunji et al., 1996). La dégradation des caséines et l'utilisation ultérieure de produits de dégradation, nécessitent un système protéolytique complexe (Gobbetti et al., 1996). Ce dernier n'est pas seulement indispensable pour le métabolisme azoté des bactéries lactiques, mais joue aussi un rôle dans le processus d'affinage de plusieurs variétés de fromages (Fox, 1989). Ce système spécialisé comprend des protéinases associées à l'enveloppe cellulaire (CEPs), des systèmes de transport permettant l'absorption des peptides résultants et plusieurs peptidases intracellulaires qui dégradent les peptides en acides aminés (Kunji et al., 1996 ; Savijoki et al., 2006)(figure 6).

Le système protéolytique des lactobacilles est moins bien étudié que celui des lactoques mais, en général, les deux possèdent des protéinases et peptidases similaires (Sousa et al., 2001).

6.1. Protéases de paroi et système de transport des peptides

La dégradation des caséines du lait est initiée par les protéases de paroi (De Vos et Siezen, 1994; Kok et De Vos, 1994; Pritchard et Coolbear, 1993; Smid et al., 1991). Ce sont des enzymes monomériques et font partie de la famille des protéases à serine (Laan et Konings, 1989). Certaines souches de bactéries lactiques ne possèdent pas de protéase de paroi et dépendent de la protéase de paroi présente chez les autres souches pour se développer dans le lait (Savijoki et al., 2006). Cinq types de protéases de paroi de la même famille mais présentent certaines différences ont été caractérisées chez les bactéries lactiques : PrtP chez *Lactococcus lactis* et *Lb. paracasei*, PrtH chez *Lb. helveticus*, PrtR chez *Lb. rhamnosus*, PrtS

chez *St.thermophilus* et PrtB chez *Lb.bulgaricus* (Savijoki et al., 2006). Elles contiennent différents domaines fonctionnels (figure 6): le domaine correspond au peptide signal (PP), le domaine catalytique des protéases à serine (PR), un domaine d'insert (I) qui régule probablement leur spécificité de substrat, le domaine A de fonction inconnue, le domaine B participant probablement à la stabilité, le domaine hélix (H) qui positionne A et B à l'extérieur de la cellule et un domaine hydrophobe (W) qui a une fonction déliement d'espace de la paroi cellulaire (Siezen, 1999 ; Fernandez-espla et al., 2000). Les oligopeptides produits par l'action de la protéase constituent la source principale d'acides aminés pour les lactocoques. Les oligopeptides sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule (Tynkkynen et al., 1993) par trois ou quatre transporteurs selon la souche. Ils appartiennent à deux grands groupes: les PRT (peptide transport) et les ABC (ATP-binding-cassette) transporteurs. Pour les premiers, le transport de peptides dépend de la force proton-motrice, pour les deuxièmes, il dépend de l'ATP. Les systèmes Opp appartiennent à la superfamille des ABC transporteurs. DtpT et DtpP sont des transporteurs proton dépendants. Ces transporteurs se distinguent par leur organisation et leur spécificité. Le système Opp transporte des peptides entre 4 et 18 acides aminés (Lamarque et al., 2004). DtpT et DtpP transportent les di- et tri-peptides (Guedon et al., 2001a; Kunjiet al., 1998). Les peptides internalisés sont ensuite hydrolysés par plusieurs peptidases différentes avec des spécificités chevauchantes dans certains cas (Guedon et al., 2001a; Kunji et al., 1998; Lamarque et al., 2004; Savijoki et al., 2006).

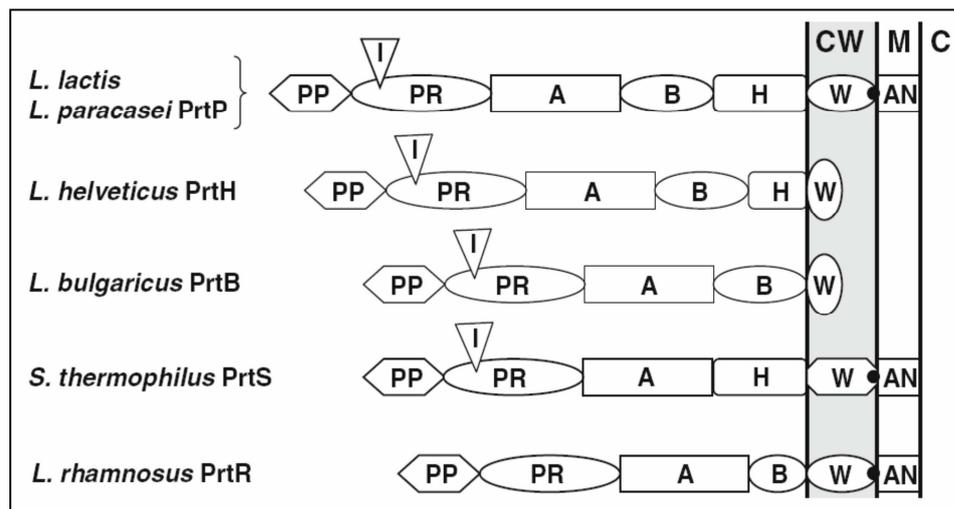


Figure 6: Représentation schématique des protéases de parois

(Siezen, 1999; Savijoki et al., 2006).

CW : paroi cellulaire ; M : membrane cytoplasmique, C : cytoplasme

6.2. Peptidases

Une grande variété de peptidases intracellulaires a été caractérisée chez les bactéries lactiques:

Les aminopeptidases générales comme PepC et PepN libèrent des acides aminés de l'extrémité N-terminale d'une grande quantité d'oligopeptides. Les aminopeptidases PepV et PepT ont aussi des spécificités de séquence très larges et hydrolysent des di- et tri-peptides, respectivement. L'endopeptidase PepO, ou encore PepF, hydrolysent des oligopeptides d'une certaine taille. Certaines peptidases hydrolysent spécifiquement certaines séquences, ainsi par exemple PepX et PepQ sont spécialisées dans l'hydrolyse des peptides contenant la proline, très abondante dans les caséines. La construction de mutants simples et multiples des gènes codant ces peptidases et le suivi de leur croissance dans le lait a permis de mettre en évidence celles qui étaient importantes pour la nutrition azotée, comme par exemple PepN, PepC, PepO, PepT et PrtP (Mierau et *al.*, 1996). Les bactéries lactiques répondent à la quantité d'azote disponible en régulant leur système protéolytique.

Guedon et *al.* (2001a) ont montré que l'expression de six gènes ou groupes de gènes, *prtP*, *prtM*, *opp-pepO*, *pepD*, *pepN*, *pepC* et *pepX* est réprimée de 5 à 150 fois suite à l'ajout d'un hydrolysats contenant 80% de peptides et 20% d'acides aminés et qu'il y a expression de ces gènes uniquement en conditions d'azote limitantes.

Il est maintenant connu que CodY régule négativement l'expression de certains gènes codant des protéines participant à la protéolyse et que cette répression est modulée par la quantité intracellulaire d'acides aminés branchés (isoleucine, leucine, valine) (Guedon et *al.*, 2001b) (figure 7). Des expériences, *in vitro*, ont montré que CodY reconnaît une séquence intégénique précédant l'opéron *opp* régulé et que les acides aminés branchés stimulent cet accrochage (Den Hengst et *al.*, 2005). Ces résultats confirment les observations réalisées par (Mierau et *al.*, 1996) lors de l'études des mutants de protéases et peptidases.

Des études de différents mutants des gènes faisant partie de la machinerie protéolytique ont permis de comprendre le rôle clé de la protéase de paroi et du transporteur d'oligopeptides dans la libération d'acides aminés à partir de la caséine. En effet, PrtP et Opp se sont avérés cruciaux pour la croissance dans un milieu contenant des caséines comme seule source

d'azote. Au contraire, le manque de DtpT n'a aucune influence sur la croissance dans un tel milieu (Kunji et al., 1998).

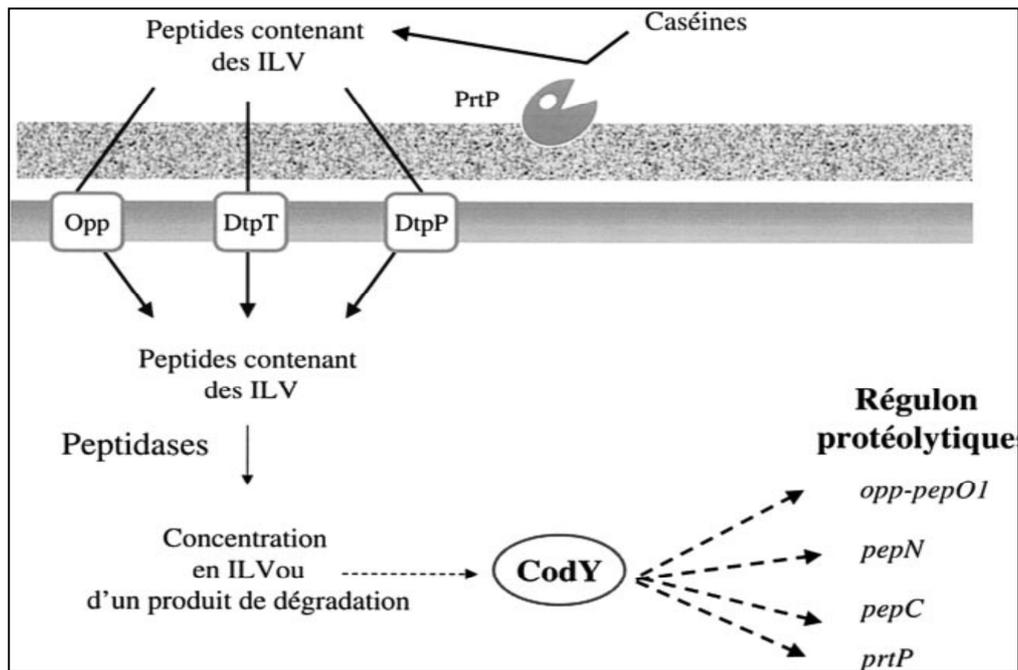


Figure 7: Modèle présentant la régulation de l'expression des gènes du régulon protéolytique de *Lc. lactis*.

7. Conséquences technologiques de la protéolyse

Les protéases de parois sont les enzymes clés du système protéolytique des bactéries lactiques et sont impliquées dans la première étape de la dégradation des caséines (Kunji et al., 1996; Savijoki et al., 2006). En plus de leur rôle vital pour la croissance bactérienne dans le lait, elles contribuent au développement de la flaveur et de la texture des produits fermentés (Fox et Wallace, 1997). En outre, certaines souches sont capables de produire des peptides possédant des activités biologiques (peptides bioactifs), qui peuvent promouvoir la santé au-delà de la nutrition traditionnelle (Meisel, 2004; Korhonen et Pihlanto, 2003). Les caséines sont particulièrement la source principale de peptides bioactifs. *Lb. helveticus* CP790, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. bulgaricus* SS1, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* FT4 sont connues pour leur capacité à produire de tels peptides par protéolyse (Gobbetti et al., 2002).

Cependant, les protéases de parois sont parfois à l'origine de peptides de petites tailles ayant une hydrophobicité élevée (partie C-terminale constituée de leucine, phénylalanine ou de tyrosine) et leur accumulation est responsable d'un défaut d'amertume (Rodriguez et al., 1996; Broadbent et al., 2002). Le choix des souches est particulièrement important pour éviter ce défaut.

Il existe aussi des souches qui sont protéases négatives. Il s'agit généralement de souches qui ont perdu leur plasmide codant pour la synthèse de la protéase de paroi. Cependant, les souches Prt- gardent souvent leurs systèmes de transport des acides aminés et des peptides, ce qui leur confère une activité peptidasique semblable à celles des souches Prt+. L'utilisation des souches Prt- présente plusieurs avantages, tout d'abord, il semblerait qu'elles soient moins sensibles à l'attaque des phages parce qu'elles se développent plus lentement. L'utilisation de ces variants réduirait également l'amertume. De plus et lors d'une fabrication fromagère, toute protéolyse s'accompagne par une perte d'azote dans le lactosérum, donc par une baisse de rendement fromager. Des pertes de 4 à 7% de caséines ont été enregistrées avec les souches de *Lc.lactis* ssp.*cremoris* Prt-. De ce fait, l'utilisation de ferments mixtes contenant des souches Prt- semble être une stratégie efficace pour augmenter les rendements fromagers (De Roissart et Luquet, 1994).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes selon leurs propriétés fonctionnelles d'intérêt technologique. Le premier groupe concerne les bactéries impliquées dans la fabrication même du produit (acidification, protéolyse...), le second groupe concerne les bactéries permettant de donner de la valeur ajoutée au produit. Il s'agit essentiellement de propriétés métaboliques secondaires, de propriétés probiotiques, de propriétés bactériostatiques ou inhibitrices contre des pathogènes alimentaires et enfin des propriétés de coopération ou d'activation entre microorganismes (Jamet, 2009).

A travers cette étude, nous avons voulu constituer un lot de souches de bactéries lactiques **naturelles** isolées à partir de lait de chèvre et de vache des populations locales ayant des fonctionnalités différentes.

1. Matériel

1.1. Source du lait

Les échantillons de lait proviennent de : Khemis Miliana, sidi Lakhder, sidi benbrika, Bir oueld Khelifa de la wilaya de Ain-Defla à partir des populations locales de vaches et de chèvres. Un total de 15 échantillons ont été collectés de différentes races bovines reconnue sous le nom **Brune de l'Atlas** (03 de Setifienne et 03 de kabyle) et caprines (05 de Kabyle et 04 de Arabia) durant le mois de Mars du période qui s'étale entre 2009-2011.

La collecte du lait a été réalisée dans des conditions aseptiques. Après lavage à l'eau javellisée et élimination des premiers jets, le lait a été recueilli dans des flacons stériles, conservé à 4°C dans une glacière et acheminé directement au laboratoire pour l'analyse.

1.2. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale dont les principaux sont les suivants :

* Le milieu MRS (Man Rogosa Sharpe) est utilisé pour la recherche des *Lactobacilles*, *Pediocoques* et *Leuconostoc*. L'ensemencement est réalisé en profondeur et en double couche;

* Le milieu M17 est employé pour la recherche des *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. L'ensemencement est réalisé en surface.

2. Méthodes

2.1. Caractérisation phénotypique, moléculaire et technologique des souches isolées à partir de lait cru de populations locales

2.1.1. Caractérisation phénotypique

2.1.1.1. Isolement et purification

L'isolement est l'étape clé qui nous permet de distinguer les différentes colonies. Pour cela, les dilutions décimales ont été initialement effectuées jusqu'à 10^{-8} .

Afin d'isoler un maximum d'espèces nous avons opté trois types d'ensemencement (en surface sur le milieu M17, en profondeur et en double couche sur le milieu MRS), en portant quelques gouttes des dilutions décimales. L'incubation est faite à 30 pendant 24h à 48 h.

La purification, c'est l'étape la plus importante car elle permet l'obtention des souches pures ce qui facilitera leur caractérisation. Elle consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon-gélose (MRS/M17 selon la souche) jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (Idoui et *al.*, 2009). La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries. La pureté des souches est contrôlée par examen macroscopique, microscopique (après coloration de Gram) avec une recherche de la catalase après chaque repiquage, et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactiques en bouillon. Les bactéries Gram positif, catalase⁻, oxydase⁻ et nitrate réductase⁻ sont retenues.

2.1.1.2. Examen macroscopique

Une observation macroscopique à l'œil nu a permis de décrire les caractères culturels des colonies obtenues sur milieu solide (aspect, forme, couleur et disposition).

2.1.1.3. Examen microscopique

Une coloration de Gram est effectuée pour chaque colonie isolée. Les cellules sont examinées au microscope optique à immersion (G x100) selon le protocole décrit par Prescott

et *al.* (2003). Celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

2.1.1.4. Recherche de la catalase

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud et *al.*, 2003).

Chez les bacilles, elle permet de distinguer les bactéries sporulées, aérobies et catalase positive appartenant au genre *Bacillus* et les bacilles asporulées catalase négative du genre *Lactobacillus*. Chez les coques, elle permet de différencier les coques lactiques qui sont catalase négative (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) et les coques non lactiques qui sont catalase positive (*Staphylococcus* et *Micrococcus*) (Guiraud, 1998).

2.1.1.5. Recherche de l'oxydase

La recherche de cette enzyme consiste à déposer dans un tube à hémolyse, un disque «Ox» et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, prélever une partie de la colonie à étudier et l'étaler sur le disque. Après environ 10 minutes une coloration violet foncé apparaît sur le disque puis vire au noir, ce qui signifie que l'isolat possède l'enzyme oxydase (Delarras, 2007).

2.1.1.6. Recherche de la nitrate-réductase

Cette enzyme est capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates (NO_3^-). À une culture en milieu nitraté âgée de 18-24 heures, on ajoute le réactif nitrate I (acide sulfanilique), puis le réactif nitrate II (α -naphtylamine). La coloration en jaune indique que le milieu ne contient plus de nitrate, la bactérie possède donc l'enzyme.

En absence de la coloration on rajoute la poudre de zinc, après environ 5 minutes, l'absence de coloration rose est interprétée comme : Nitrate⁺ (bactéries réduisent les nitrites jusqu'au stade azote gazeux) (Larpent, 1997).

2.1.1.7. Conservation

- Repiquages successifs : Cette méthode est utilisée pour une conservation des souches pures à courte durée. Les souches pures sont cultivées sur milieu solide incliné dans des tubes. Après la croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines.

- Congélation : La conservation à long terme des souches pures est réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05% d'extrait de levure et 0.05% de glucose) et 30% de glycérol et stockées à une température de -20°C (Samelis et *al.*, 1994).

2.1.1.8. Identification des isolats

L'identification des souches isolées a été réalisée par l'application des méthodes classiques décrites par Guiraud et Galzy, (1980); Petransxiene et Lapied, (1981); Larpent, (1997); Guiraud, (1998); Bourel et *al.* (2001); Badis et *al.* (2005); Gusils et *al.* (2010).

2.1.1.8.1. Croissance à différentes températures

Elle permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS/M17 par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 37°C et 45°C. La croissance est appréciée par un trouble du milieu. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas. La thermorésistance est un critère de classification qui permet d'étudier la résistance à certain traitement thermique. Elle est testée à 65°C pendant 30 min.

2.1.1.8.2. Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Mac Cleskey a été inoculé par les cultures bactériennes, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube.

2.1.1.8.3. Croissance des souches dans des conditions hostiles

2.1.1.8.3.1. Croissance à différents pH

Elle est étudiée sur le bouillon MRS : ajuster le pH à 4,5 à l'aide d'une solution de HCl (ou à l'aide d'une solution de soude 1N pour le pH 6,5), puis ensemercer les différentes souches et incubé à 30°C pendant 24h à 72h. L'apparition d'un trouble indique la croissance.

2.1.1.8.3.2. Culture sur milieu hypersalé

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemençées sur des bouillons de MRS/M17 à 2%, 4% et à 6,5% de NaCl. Après une incubation à 30°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

2.1.1.8.3.3. Croissance sur le lait bleu de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemençée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0,1%. Après 24h à 48h d'incubation, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer.

La décoloration du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (Delarras, 2007).

2.1.1.8.3.4. Résistance au tellurite

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemençement en stries très serrées, la gélose à 0,4% de tellurite de potassium par les cultures à tester. Après une période de 24h d'incubation, les bactéries qui résistent, donnent des colonies noires.

2.1.1.8.4. Activité Arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Môeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation pendant au moins 4 jours, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune (Moeller, 1955).

2.1.1.8.5. Hydrolyse de l'esculine

Elle est mise en évidence sur le milieu gélosé à la bile esculine après incubation des cultures à 30°C pendant 72 h. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone (l'esculétine) qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture (Delarras, 2007).

2.1.1.8.6. Recherche de la citratase

Cette enzyme a été mise en évidence par culture sur gélose semi solide au lait citraté. La gélose a été ensemencée en masse et incubée pendant 3 à 5 jours. La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu, c'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et acétoïne.

2.1.1.8.7. Croissance sur lait tournesolé

Ce milieu est composé de 1L de lait écrémé et de 10 mL de teinture de tournesol à 4%. Le milieu est réparti en tube à essai. Après sa stérilisation (à 110°C pendant 15 min), il est inoculé avec les souches des cultures denses et incubé durant 72 h. La présence du tournesol considéré comme un indicateur de pH du milieu, permet d'observer plusieurs types de réactions: attaque de lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au rouge), attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu), peptonisation de la caséine après ou en dehors de toutes coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulât) et réduction du colorant (décoloration).

2.1.1.8.8. Profil fermentaire des sucres

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés carbonés, en particulier des sucres. Le milieu utilisé est le bouillon MRS (sans glucose et sans extrait de viande) additionné de 40 mg/L de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (Mannu et *al.*, 2000). Le glucose est alors remplacé par le composé à tester, filtré sur membrane et introduit en solution à concentration finale de 1% des carbohydrates suivants : glucose, lactose, galactose, xylose, amidon, fructose, saccharose, Dextrine, cellobiose, adonitol, arabinose, raffinose, sorbitol, salicine, et mannitol.

Les solutions de sucres sont préparées dans 100 mL d'eau distillée à raison de 20% des différents sucres. La croissance est appréciée par virage de l'indicateur de pH. Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'addition d'une couche d'huile de paraffine stérile à la surface du milieu (Samelis et *al.*, 1994). L'acidification est appréciée après 18 à 72h par virage du milieu au jaune

2.1.2. Caractérisation moléculaire (Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA)

2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN a été extrait des isolats selon Fischer et *al.* (1997) et a été utilisé comme matrice pour l'amplification partielle des ARNr 16S.

À partir d'une culture de 24 h d'incubation à 37°C,ensemencée à 1% (v/v) dans 50 mL de milieu MRS, les cellules bactériennes ont été récupérées par une centrifugation de 10 min à 3900 x g à 4°C, lavées 2 fois avec 5 mL de tampon TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) et remises en suspension de 5 mL de TE. Afin d'hydrolyser la paroi des bactéries, 250 µL d'une solution de lysozyme (Roche) 5% (m/v) ont été additionnés. Après 1h d'incubation à 37°C, 600 µL d'EDTA (0,5 M pH 8) et 50 µL d'une solution de protéinase K (Roche) 2% (m/v) ont été ajoutées et l'ensemble est incubé pendant 15 min à 37°C. Puis, 660 µL d'une solution SDS 10% (m/v) ont été ajoutés et l'ensemble a été incubé à 50°C jusqu'à ce que les cellules soient lysées (environ 1h30). Le lysat est reparti en fractions aliquotes de 1 mL, puis 350 µL d'acétate de potassium froid (5M acétate, 3M potassium) ont été ajoutés à chaque fraction aliquote. Après 15 min d'incubation sur glace, les surnageants contenant les acides nucléiques ont été récupérés après centrifugation (15 min, 12000 x g à 4°C). Les ARN ont alors été éliminés par addition de 5 µL d'une solution de RNase A (Roche) 1% (m/v). Après 60 minutes d'incubation à 37°C, un volume d'isopropanol froid est ajouté à un volume

de surnageant afin de précipiter l'ADN génomique. Le culot est alors lavé avec 1 mL d'éthanol 70% (v/v), séché pendant 15 min à 42°C puis solubilisé dans 100 µL d'eau ultra pure. La mesure des absorbances a permis d'estimer la concentration ($A_{260\text{nm}}$) et la pureté (rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de l'ADN.

La qualité de l'ADN extrait a été également vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% (m/v) (Sambrook et al., 1989). Les fragments d'ADN ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne. Les marqueurs de tailles utilisés sont les EZ-LOAD 100pb (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les amorces universelles sont SSU for (3'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-5') et SSU rev (5'-GACGGGCGGTGTACAA-3').

2.1.2.2. Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA

L'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase PCR est une méthode d'amplification génique, *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre, une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique; séquence spécifique d'ADN et des amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse. Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants :

- * Dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire ;
- * Hybridation à l'ADN cible des deux oligonucléotides utilisés comme amorces ;
- * Elongation de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg^{++} .

Dans le présent travail, les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un thermocycleur My Cycler'' PCR (Bio-Rad). Le mélange réactionnel contient : 2 µL de tampon de PCR concentré 10X (Fermentas), 1,2 µL de $MgCl_2$ à 25mM, 0,4 µL du mélange de dNTP à 10mM, (Fermentas), 1 µL de chaque amorce à 10 µM, 0,5 U de Taq polymérase (Fermentas) et environ 100-200ng d'ADN génomique dans un volume final de 20 µL (tableau 6).

Tableau 6 : Préparation des échantillons pour la PCR.

Réactifs	Volume (μL)
Eau ultra-pure	13,3
Tampon (10X) Fermentas	2
MgCl ₂ (25 mM) Fermentas	1,2
dNTP (10 mM) Fermentas	0,4
Taq polymérase (5 U. μL^{-1})	0,1
ADN (100 ng. μL^{-1})	1
Amorce Forward (10 μM)	1
Amorce Reverse (10 μM)	1

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes: une première étape de dénaturation à 94 °C pendant 4 min. Ensuite, le mélange a été soumis à 35 cycles de trois étapes de 30s chacune (une étape de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation des amorces à la température spécifique 58°C et d'une phase d'élongation à 72°C). Une élongation finale à 72°C pendant 10 min a été réalisée (figure 8). À terme du programme de la PCR, l'amplicon ou l'ADN synthétisé est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

<i>Dénaturation</i>		<i>Hybridation</i>	<i>*Elongation</i>	
<i>94°C/4 min</i>	<i>94°C/30 s</i>	<i>58°C/30 s</i>	<i>72°/45 s</i>	<i>72°C/10 min</i>
<i>35 cycles</i>				

* Le temps d'élongation est variable selon la taille du gène à amplifier (1 min pour 1 kb pour la Taq polymérase de la société Fermentas).

Figure 8 : Programme PCR suivi pour amplifier le gène 16S rDNA des souches étudiées

2.1.2.3. Electrophorèse d'ADN

Les amplicons ont été analysés sur un gel à 1% (m/v) d'agarose en TAE 0,5X (Tris acétate 20mM, EDTA 0,5mM). Les fragments ont été ensuite visualisés sous UV à 254_{nm} après incubation des gels dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 15 min. Les gels ont été analysés grâce à l'utilisation d'un appareil GelDoc (BioRad) et du logiciel d'analyses d'images Quantity One. La détermination des concentrations a été réalisée

en comparant l'intensité de la bande à 1000 pb de chaque échantillon à celle de la bande correspondante pour le marqueur de poids moléculaire.

Le séquençage d'ADN été effectué par la société Beckman Coulter Genomics (<https://myproject.beckmangenomics.com/myp/home?siteid=col&mapid=home>). Une recherche d'homologie a été effectuée en utilisant le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les alignements multiples ont été réalisés à l'aide du programme ClustalW de Bioedit et DNAbaser.

2.1.2.4. Phylogénie moléculaire du gène 16S rDNA

Nous avons réalisé une analyse phylogénétique en utilisant les séquences partielles du gène 16S rDNA des souches étudiées et les séquences obtenues à partir des bases de données (GeneBank) pour des **souches de référence** représentées par : *Lactobacillus casei* ATCC393, *Lactobacillus paracasei* JCM8130, *Lactobacillus paracasei* NBRC 15906, *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136, *Lactobacillus plantarum* DK022, *Lactobacillus plantarum* NRRLB14768, *Lactobacillus paraplantarum* DSM10667, *Lactobacillus pentosus* JCM1558 et la séquence du 16S rRNA de *Bacillus subtilis* DSM10 a été utilisée comme séquence du groupe extérieur (**Outgroup**). L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Le logiciel **MEGA 7** a été utilisé.

2.1.3. Caractérisation technologique

2.1.3.1. Production d'arômes

Elle est détectée par la réaction de Voges Proskawer sur lait écrémé à 9%. La mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est obtenue après addition de quelques gouttes de réactif VPI et VP II et le et Après agitation durant 10 min une coloration rose indique la présence l'acétylméthylcarbinol. Cette dernière se transforme en acétoïne sous l'action de la soude avec le α naphtol, présents dans les deux reactifs en donnant un complexe rouge (Guiraud, 2003).

2.1.3.2. Production des exopolysaccharides (dextrane)

Les souches à tester ont étéensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (Leveau et *al.*, 1991).

La quantification des exopolysaccharides (EPS) a été réalisée par la technique décrite par Mozzi *et al.* (2001) et Wu *et al.* (2010): pour chaque souche, 100 mL du bouillon MRS/M17 a été inoculé par la culture à tester à raison de 1%. Après une incubation de 24h, la culture a été centrifugée à 6000rpm pendant 20min. À un volume de surnageant, deux volumes de l'éthanol à 4°C ont été ajoutés, le tout a été incubé pendant une nuit à 4°C. Les précipités ont été récupérés par centrifugation à 6000 rpm pendant 5min et resuspendus dans 2mL d'eau distillée. Le mélange précipité-eau a été filtré sur un millipore de 0,22 µm de porosité. Ensuite, 40µL du phénol à 80% et 2 mL de l'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à chaque 800 µL du filtrat suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 490_{nm} (DO₄₉₀), les résultats sont exprimés en grammes des EPS par litre (g/L). Le taux de sucre est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage tracé avec du glucose.

2.1.3.3. Lipolyse

Elle est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière a été coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stériles ont été déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit 10µl d'une culture jeune. Après une incubation pendant deux jours, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (Guiraud, 2003). La lécithinase a été détecté par la formation des opacifications sur gélose enrichie de jaune d'œuf, ensemencée par touches ou par une strie centrale à la surface (Guiraud, 2003).

2.1.3.4. Mise en évidence de la protéolyse

2.1.3.4.1. Cellules bactériennes

Pour déterminer l'activité protéolytique des cellules bactériennes, la gélose MRS/M17 additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stériles ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (Vuillemand, 1986).

2.1.3.4.2. Dans les surnageants des cultures

Des cultures bactériennes de 48h d'incubation sur MRS-Lait (2%) sont centrifugées (6000 rpm/10 mn, 4°C) et les surnageants sont récupérés puis testés pour leur activité protéasique par la méthode des puits sur milieu Agar-Lait (1%) contenant 0,02% NaN₃. La protéolyse des caséines du lait se manifeste par la présence d'un halo clair autour des puits (Roudj et *al.*, 2009).

L'activité protéolytique est évaluée en milieu solide par la mesure du carré du diamètre du halo, exprimé en mm², comme décrit par Chantawannakul et *al.* (2002).

2.1.3.5. Mise en évidence de la relation entre le pouvoir acidifiant et la production des protéases

2.1.3.5.1. Pouvoir acidifiant

L'activité acidifiante des souches a été déterminée par mesure de pH des cultures inoculées à raison de 1% (v/v) dans le lait écrémé reconstitué à 10% après 6h, 12 et 24h, et simultanément, par dosage de l'acidité titrable en présence de phénolphtaléine (Larpen, 1997). L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

Où VNaOH: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10mL de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

2.1.3.5.2. Dosage de l'activité protéolytique

Les bactéries à tester ont été cultivées dans le bouillon MRS à raison de 2% (v/v) et incubées à 37°C pour 0, 6, 24 et 48 heures. Après incubation, Les cultures ont été ensuite centrifugées à 8 000 x g à 4°C pendant 20 min. Les surnageants ont été utilisés comme solutions d'enzymes.

L'activité protéasique de surnageant de la culture a été déterminée par la méthode de Chopra et Mathur., (1983). Un mL du substrat (1% de caséine dans le tampon phosphate 0,05 M, pH 7) est incubé à 37 °C pendant 15 minutes, puis 1 mL de surnageant est ajouté.

Après mélange, la réaction est terminée par addition de 2mL de TCA 0,4 M, puis filtré et le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 20min. Pour le blanc, avant l'addition d'enzyme, le substrat est précipité avec du TCA, puis traité comme décrit ci-dessus. À 1mL du filtrat obtenu après précipitation au TCA, 5 mL de carbonate de sodium 0,4 M et 1mL de réactif de folin sont ajoutés et le tout est incubé à 37°C pendant 20 min. La lecture de l'absorbance A est faite à 750_{nm}. Une courbe standard de la tyrosine a été préparée dans les mêmes conditions, et les activités protéolytiques sont exprimées en Unités/mL.

2.2. Mise en évidence, *in vitro*, de quelques propriétés probiotiques

2.2.1. Aspect sanitaire

2.2.1.1. Hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24h, le type d'hémolyse a été examiné. Les streptocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies); β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié) (Idoui et Karam, 2008).

2.2.1.2. Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide décrite par Idoui et al. (2007) est appliquée: chaque inoculum bactérien standardisé à 0,08 et 0,1 (DO₆₆₀), a servi pour inonder la surface de la gélose MRS, puis, l'excès de l'inoculum est récupéré par une micropipette. Les boîtes sont laissées sécher à température de laboratoire. Les disques antibiotiques sont par la suite déposés en surface de la gélose. La résistance des souches est testée contre les antibiotiques suivants : Amoxicilline (AMC 20 μ g), Oxacilline (OX 30 μ g), Vancomycine (VA 30 μ g), Rifampin (5 μ g), et Ciprofloxacine (5 μ g), Gentamicine (10 μ g) et acide nalidixique (Na 30 μ g).

Après 24h d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés. Par convention, les mêmes auteurs ont considéré que pour un diamètre inférieur à 15mm, la

souche est résistante (R) et pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm la souche est sensible (S).

2.2.2. Tolérance à l'acidité

L'une des conditions principales pour qu'une souche puisse répondre à la définition de « probiotique » est qu'elle doit être viable de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal. Avant de pouvoir adhérer et s'installer, même de façon transitoire, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac. Afin de déterminer cette capacité de survie chez les souches V1, V2, V3, V4, C1, C3, C5, C7, C10 et C12 et les cultures mixtes CM1 (V1, V2 et V4), CM2 (C5, C7 et C12), CM3(C10 et C8) et CM4 (C1 et C3), l'effet de l'exposition à un milieu acide sur ces bactéries a été déterminée selon la technique décrite par Hydrominus et *al.* (2000). Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min, puis les cellules ont été suspendues dans le bouillon MRS ajusté à différentes valeurs de pH (pH2; pH2,5) et pH 6,5 comme contrôle pendant 120 minutes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après incubation par rapport à la concentration initiale.

2.2.3. Résistance aux sels biliaires

Pour la détermination de l'aptitude des différentes cultures à résister à la bile, la méthode décrite par Hydrominus et *al.* (2000) a été appliquée. Les cellules bactériennes sont transférées dans le bouillon MRS à 0,3 % de sels biliaires et à différents pH (pH 2 ; pH 2,5 et pH6,5). Les résultats sont exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après deux heures d'incubation par rapport à la concentration initiale.

2.2.4. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par Iyer et *al.* (2010). Des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à froid à 12000 rpm/5min suivie de deux lavages successifs puis resuspendu dans 1,2 mL de tampon urée phosphate magnésium (pH 6,5). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1,0 à 450_{nm} (DO initiale).

Ensuite 0,6 mL du xylène a été ajouté doucement à 3 mL de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité pendant 2min. Après 15 min, la

phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale (DO finale).

La différence de la densité optique est considéré comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculée par l'équation suivante:

$$\text{Hydrophobicité (H\%)} = \text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale} \times 100$$

2.2.5. Activité antibactérienne

Les souches indicatrices pour l'activité antibactérienne sont: *Pseudomonas aeruginosa* ; *Niesseria gonrrheae*; *Klebsiella pneumoniae* ; *Escherichia coli*, souches pathogènes fournies par le laboratoire d'analyses privé de Docteur Zibouche, Ain Defla.

2.2.5.1. Effet des cellules bactériennes

La méthode des disques décrite par Tadesse et *al.* (2004) a été appliquée. Elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller-Hinton par la souche indicatrice (DO₆₆₀ varie entre 0,08 et 0,1). Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10µL d'une culture lactique jeune. Une fois les boites sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C pendant 4h, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

2.2.5.2. Effet du surnageant

Un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène puis les disques stériles sont remplis par 60 à 80 µL de surnageant filtré et neutralisé, obtenu après centrifugation à 4 000 rpm pendant 15 min d'une culture de la souche lactique (Labioui et *al.*, 2005). Les disques sont ensuite déposés sur le milieu de culture, la diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boites à 37°C pendant 24 heures.

L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques (Achemchem et Abrini, 2005). Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques ont été mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition (Z_i) est supérieur de 2mm (Tabak, 2007).

$$Z_i \text{ (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (5mm)}$$

2.3. Traitement des données et Analyse statistique

Le logiciel SPSS (version 20, SPSS IBM) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les résultats ont été considérés comme non-significatif lorsque $P > 0,05$ en appliquant le test t (2-tailed). Le test Pearson de corrélation a été réalisé pour examiner les diverses corrélations.

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Caractérisation phénotypique, moléculaire et technologique des souches isolées à partir de lait cru de populations locales.

1.1. Caractérisation phénotypique

1.1.1. Isolement

Soixante-six bactéries ont été isolées des différents laits collectés dans la région de Ain defla. Après purification sur les milieux MRS et M17, les isolats étaient examinés au microscope puis testés pour leurs activités catalase, peroxydase et nitrate réductase. Les bactéries lactiques sont Gram positives, catalase⁻, peroxydase⁻ et nitrate réductase⁻.

1.1.2. Identification phénotypique des bactéries lactiques isolées

1.1.2.1. Examen macroscopique et microscopique

Au cours de la purification, n'ont été conservés que les isolats qui abordent les caractéristiques communes, propres aux bactéries lactiques. Sur un total de 66 isolats, Vingt souches montrées positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ou cocci qui ont été retenues (Badis et *al.*, 2004; Axelsson, 2004). Les cellules étaient souvent disposées en courtes ou longues chainettes, ou tétrades, cependant des structures isolées et des diplocoques étaient également observés. En outre, l'examen macroscopique de leurs colonies obtenues sur gélose MRS ou M17 a révélé qu'elles étaient circulaires ou lenticulaires, de couleurs blanchâtres, blanc-crème, parfois translucides et lisses, convexes ou plates. Elles étaient négatives aux réactions de la catalase, la peroxydase et la nitrate réductase. Sur bouillon, les bactéries présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques (Guiraud, 2003).

La Figure 9 montre l'aspect macroscopique des colonies de lactobacilles et des coques cultivées sur gélose MRS et M17. La figure 10 montre l'aspect microscopique après coloration de Gram (grossissement X100).



Figure 9: Aspect des colonies ensemencées en surface après 48h d'incubation à 30°C.

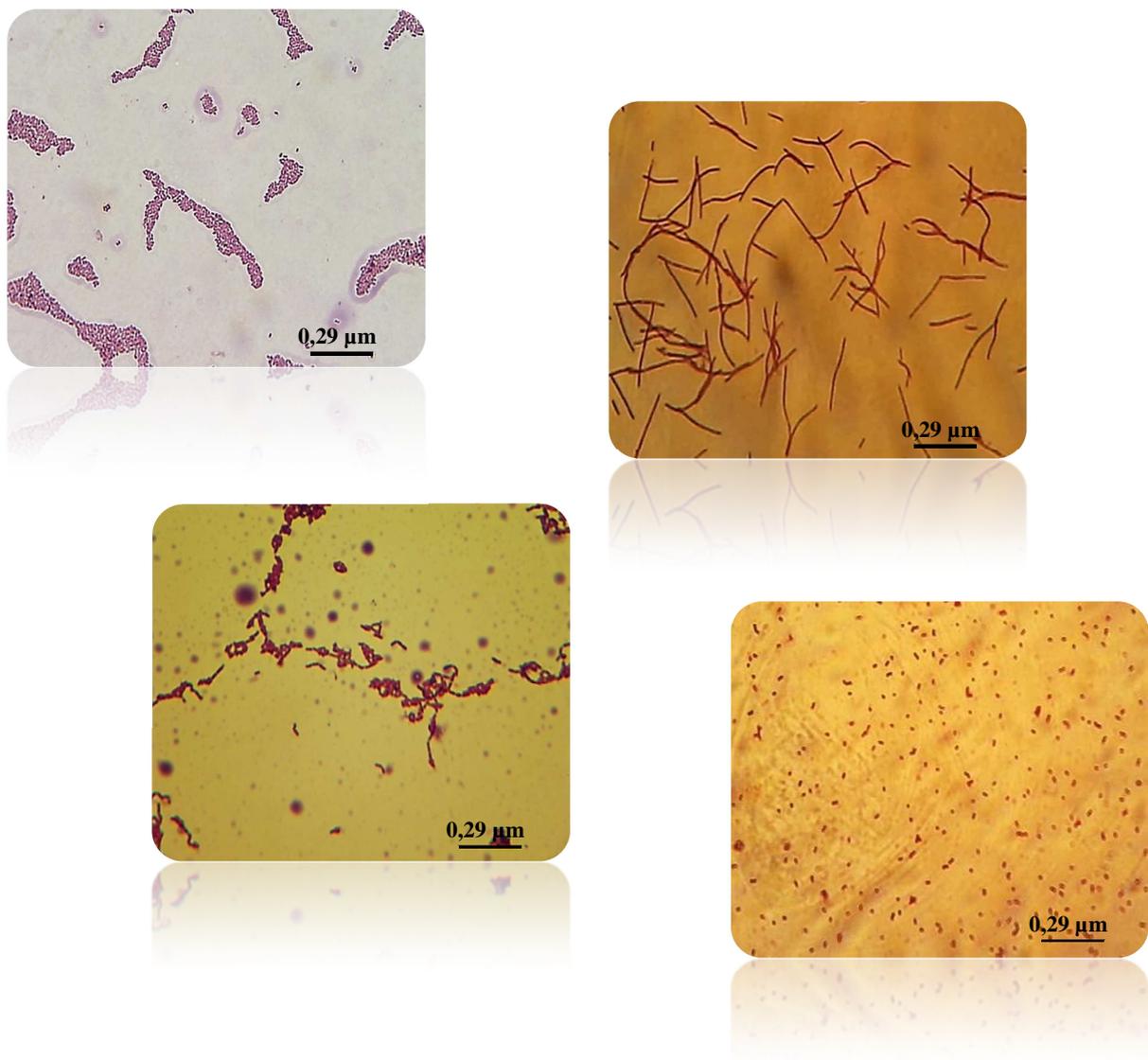


Figure 10 : Observations microscopiques des bactéries lactiques isolées après la coloration de Gram au Gx100.

1.1.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Les résultats des tests effectués pour l'identification biochimique et physiologique des bactéries pré-identifiées sont rassemblés respectivement dans le tableau 7

L'étude de type fermentaire permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Parmi les coques, seule la souche V3 qui possède le caractère hétérofermentaire. Pour les lactobacilles, Cette capacité n'a été observée que chez C4 et C8. En effet, seuls les lactobacilles appartenant au groupe de *Betabacterium* qui peuvent produire de CO₂ à partir de glucose.

La croissance à différentes températures permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile. L'emploi des différents tests (l'hydrolyse de l'arginine, la croissance en présence de NaCl (2 ; 4 et 6,5%), le développement au pH 4 et 6,5, l'utilisation du citrate...) ont été également réalisés afin de distinguer entre les groupes. La différenciation entre les espèces a été complétée par l'étude de leurs profils de fermentations des carbohydrates.

Les caractères phénotypiques (cultureux, biochimiques et physiologiques) ont permis de mettre en évidence cinq genres avec dix espèces différentes dont les plus fréquemment rencontrées sont les Lactobacilles :

* Parmi les sept isolats de cocci, cinq peuvent croître à 10 et non pas à 45°C, ne survivent pas après leur exposition à 65°C et poussent en présence de 4% de NaCl dont trois souches (C1, V1 et C11) sont ADH+, ne produisent pas de gaz à partir de citrate et hydrolysent l'esculine. Ces souches semblent être *Lc. lactis subsp. lactis* (Ballows et al., 1991) et deux souches V8 et C3 ont été rattachées à *Pediococcus parvulus*. En plus de leur mode d'association en tétrades, ce sont des homofermentaires, présentent une croissance positive en présence de sel (6,5% de NaCl) et hydrolysent l'arginine. Pour le genre *Leuconostoc*, une seule espèce a été rencontrée dans le lait de vache représentée par V3 : *Ln. pseudomesenteroides* capable de croître à 10°C et à 45°C, hétérofermentaire et produit de l'acétoïne. De même, Une seule espèce a été apparentée à *St. thermophilus* (C12) qui est capable de croître rapidement à pH 6,5 ; n'hydrolysant pas l'arginine ni l'esculine, ne réduisant pas le bleu de méthylène et produit de l'acétoïne.

* La forme bacillaire a été trouvée chez treize isolats et représentée par le genre *Lactobacillus*. Sur la base des différentes températures de croissance, l'hydrolyse de l'arginine, et le type fermentaire, Ils sont subdivisés en trois groupes (Collins et al., 1987; Charteris et al., 2001; Hammes et Hertel, 2003):

*Les bactéries homofermentaires et qui font partie du groupe *Streptobacterium* peuvent être représentées dans notre étude par V2, V5, C5, C6, C7 et C10. Une faible tolérance au sel a été observée pour les souches identifiées comme étant *Lb.casei* (V2, V5, C5). Elles sont différenciées par la capacité d'utilisation de xylose. Les souches C7 et C10 fermentent la plupart des sucres testés et sont rapprochées de l'espèce *Lb. plantarum*. Tandis que la souche C6 apparentée à *Lb. paracasei* est incapable d'utiliser l'arabinose et le raffinose (Ballows et al., 1991) en plus de l'adonitol, l'amidon et le xylose.

* Les bactéries homofermentaires et ne se développent pas à 10°C, font partie du groupe *Thermobacterium* qui peuvent être représentées par V6, V7, C2, et C9. La souche V7 ne fermente ni le dextrine ni le raffinose et fermente lentement le lactose, peut être rapprochée de l'espèce *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, Tandis que La souche V4 fermente tous les sucres à l'exception du xylose. Elle est apparentée à *Lb. delbrueckii* subsp.*lactis*. La souche C9 peut être rapprochée à l'espèce *Lb. acidophilus*. Deux isolats de *Lb. animalis* représentées par C2 et V6 avec quelques différences de fermentation des carbohydrates observées ; V6 fermente lentement l'adonitol, l'arabinose, le dextrine et le xylose alors que C2 ne fermente ni l'adonitol, ni le xylose.

* Les bactéries hétérofermentaires font partie du groupe *Betabacterium* qui peuvent être représentées par C8 et C4. La souche C8 apparentée comme étant *Lb. plantarum* est capable de croître à 10 et à 45°C, ne produit pas de NH₃ à partir de l'arginine (Collins et al., 1989). Elle tolère une concentration de 6,5% (p/v) de NaCl. Alors que C4 se développe à 10 mais pas à 45°C. Elle fermente la majorité des sucres sauf l'adonitol, l'amidon et le xylose.

La classification des Lactobacilles pourrait être mieux menée si nous avons entamé la recherche de production de gaz à partir de gluconate, en plus du test de production de gaz à partir de glucose. Cela nous aurait sans doute permis de classer plus facilement les Lactobacilles isolés selon leur type de fermentation (Lactobacilles homofermentaires, Lactobacilles hétérofermentaires, Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires) comme décrit par Demarigny et al. (1996); Badis et al. (2005).

Tableau 7 : Caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques isolées.

Souche	Catalase	Oxydase	Nitrate-réductase	ADH	Thermorésistance	Bleu de Méthylène 0.1 %	Lait tournesolé		Acétoine	Esculine	Type fermentaire	Citratase	tellurite	Température (°C)			pH		NaCl (%)		
							Réduction	Coagulation						10	37	45	4	6,5	2	4	6,5
V1	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	HO	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
V2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	HO	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
V3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	HE	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
V4	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	HO	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
V5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	HO	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
V6	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	HO	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
V7	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	HO	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
V8	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	HO	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
C1	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	HO	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
C2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	HO	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
C3	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	HO	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
C4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	HE	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
C5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	HO	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C6	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	HO	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
C7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	HO	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
C8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	HE	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	HO	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
C10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	HO	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
C11	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	HO	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
C12	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	HO	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

(+) : réaction Positive ; (-) : réaction Négative ; (HO) : homofermentaire ; (HE) : hétérofermentaire

En général, l'utilisation des sucres est variable et semble être dépendante des souches. A titre d'exemple, Les quatre souches de *Lb. casei* des populations différentes (caprine et bovine) sont différenciées par la capacité d'utilisation de xylose tandis que les souches de *Lb. plantarum* fermentent le mannitol et le raffinose (Schillinger et Lucke, 1987).

Les bactéries lactiques sont exigeantes au plan nutritionnel et la différence réside dans les genres rencontrés et leur répartition (Deguchi et Morishita, 1992). Celle-ci pourrait dépendre de la source du lait, de la localisation géographique, du type de fourrage ingéré par l'animal, de l'état sanitaire de l'animal, de la saison, des conditions de traite, de la durée de conservation... (Zadi-Karam et Karam, 2006).

Les résultats trouvés au cours de ce travail s'accordent à ceux trouvés par Bekhouche., (2006) qui a isolé deux souches *Lc. lactis* subsp. *lactis* (LS13 et LS15) à partir des laits crus provenant des vaches importées et élevées dans des stations d'élevages situées dans la wilaya de Constantine. Les mêmes espèces ont été identifiées par Saidi, (1998) et Kacem et al., (2003) à partir des laits crus de vaches produites dans la région de l'ouest algérien et par Zadi-Karam., (1998) dans le lait de chamelle.

Le même auteur Bekhouche, (2006) a identifié une seule souche de *Lb. plantarum* LLb6 ; Alors que les souches du genre *Lactobacillus* isolées par Karam, (1995) appartiennent essentiellement à l'espèce *Lb. plantarum*. Des résultats similaires ont été également trouvés par Mami, (2012) qui a isolé 8 souches de lactobacilles à partir de lait de chèvre appartenant essentiellement à *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. sakei* subsp. *sakei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Feutry et al., (2012) ont montré une notable diversité phénotypique de *Lb. paracasei*.

Les pedicoques n'ont pas été mis en évidence dans la plupart des échantillons du lait à l'exception de deux souches V8 et C3. Même résultat a été trouvé par Badis et al. (2005) qui ont trouvé que le nombre d'isolats de pedicoques était toujours faible même dans les échantillons de la population caprine Arabia. Dans la même population, les mêmes auteurs ont identifié une souche de *Lb. animalis* et une souche de *Lb. acidophilus*. Ces résultats s'accordent avec les nôtres.

Le genre *Lactobacillus* a été signalé comme le genre majoritaire de la flore lactique des laits de vache, de brebis et de chèvre d'Algérie (Badis et al., 2005; Zadi-Karam et Karam, 2006).

Une distribution hétérogène avec une grande fréquence de *Leuconostoc*, suivi de *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Streptococcus* a été trouvée dans le lait de vache de l'Est algérien (Bekhouche et al., 1998).

Toutefois, pour Sawaya et al. (1984), une relation existe entre la composition en bactéries lactiques, la composition du lait et l'alimentation. Les bactéries lactiques sont exigeantes au plan nutritionnel (Deguchi et Morishita, 1992). La différence réside dans les genres rencontrés et leur répartition. Celle-ci pourrait dépendre de la source du lait, de la localisation géographique, du type de fourrage ingéré par l'animal, de l'état sanitaire de l'animal, de la saison, des conditions de traite, de la durée de conservation...etc. (Zadi-Karam et Karam, 2006).

Badis et al. (2005) ont constaté dans leur étude que l'identification des isolats par les méthodes classiques présente beaucoup de difficultés car des différences significatives dans les profils de fermentation des sucres ont été observées. Par conséquent, l'identification génotypique est indispensable pour confirmer la classification phénotypique

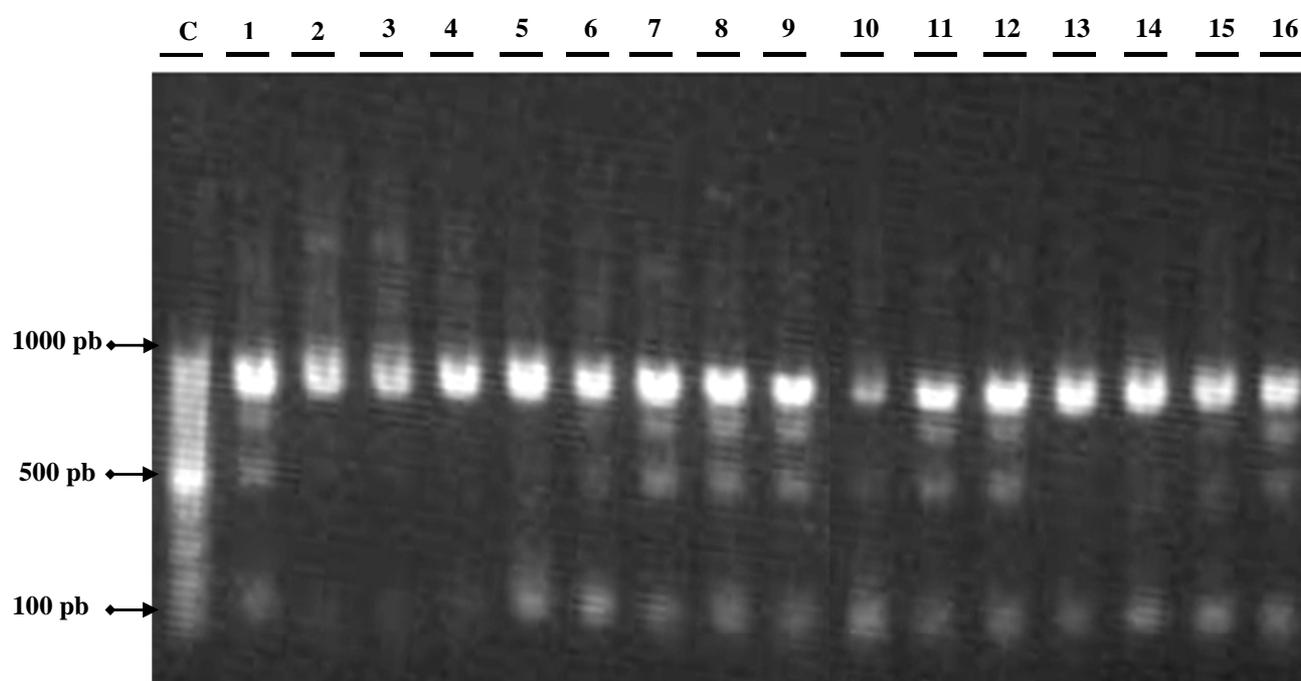
1.2. Caractérisation moléculaire

1.2.1. Amplification et séquençage partiel de 16S rDNA

La qualité de l'ADN total extrait pour chaque souche a été vérifiée en mesurant le rapport d'intégrité entre DO_{260} et DO_{280} . Elle est réalisée avec quatre échantillons par souche. Si le facteur d'intégrité est compris entre 1,8 et 2, l'intégrité de l'ADN est considérée comme très bonne.

La taille des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence du marqueur de poids moléculaire MPM. Les résultats sont présentés dans la figure 11. La bande spécifique à 1000 pb se retrouve correctement pour les ADN des souches utilisées. Ce qui explique le bon déroulement de l'amplification.

Les produits purifiés de l'amplification du gène ARNr 16S ont été envoyés au service du séquençage de la société Beckman Coulter Genomics (<https://myproject.beckmangenomics.com/myproject/home?siteid=col&mapid=home>). Une fois reçus sous forme de chromatogrammes (Figure 12), et après correction, une recherche d'homologie a été effectuée en utilisant le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les alignements multiples ont été réalisés à l'aide du programme Clustal W de Bioedit et DNAbaser. Un exemple de séquence traitée est présenté dans la figure 13.



Canal 1 : C1,	Canal 2 : C2,	Canal 3 : C3,
Canal 4 : C4,	Canal 5 : C5,	Canal 6 : C6,
Canal 7 : C7,	Canal 8 : C8,	Canal 9 : C9,
Canal 10 : C10,	Canal 11 : C11,	Canal 12 : V1,
Canal 13 : V2,	Canal 14 : V3,	Canal 15 : V5,
Canal 16 : V8,	C : marqueur de taille (contrôle) ;	

Figure 11 : Migration sur gel d'agarose des ADNr 16S amplifiés des souches examinées.

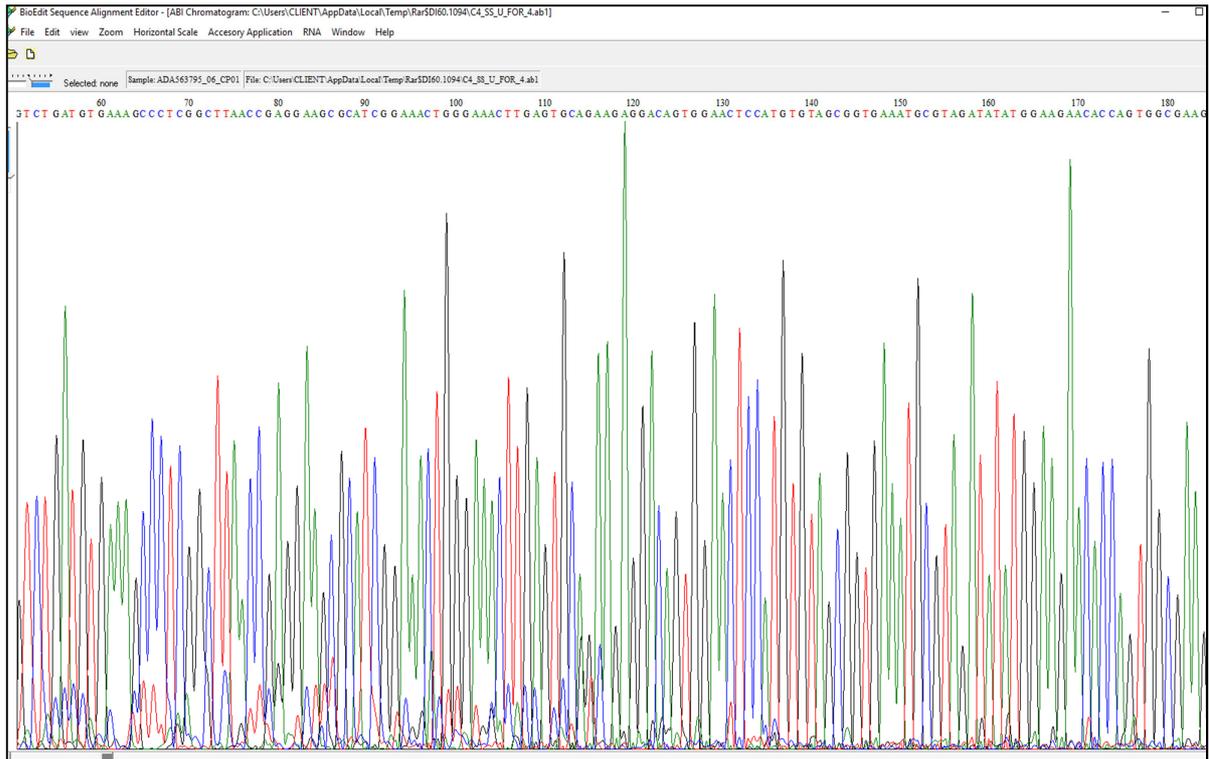


Figure 12 : Traitement avec le logiciel BioEdit des chromatogrammes obtenus pour les séquences partielles du gène 16S rDNA.

```

GGGCGCTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGG
GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCG
CCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAA AATGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCC GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCA
CTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGG
TACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTC
TCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACC
CCCCCCCCCGTCAA

```

Figure 13: Exemple d'une séquence nucléotidique de la souche *Lactobacillus casei* C4 après analyse et traitement par le logiciel BioEdit

Description		Description				
C7_SS_U_FOR_7_copy_coRR	nucleic acid	Nucleotide collection (nt)				
Molecule type	829	Program	BLASTN 2.6.0+ Citation			
Query Length						
Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results						
Graphic Summary						
Descriptions						
Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain AO10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KX273834.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain PT0010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KX074211.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain SFL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KP345894.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain H1S1L5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KP345893.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain H3S1L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KP345892.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain CRD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KJ769141.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain SD3S6L1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KJ095653.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain AA2-518F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KF023270.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain AT7-518F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KF023269.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain AT4-518F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KF023266.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus pentosus strain CC2-800R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KF023243.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain BA4-800R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1487	1487	100%	0.0	99%	KF023218.1

Figure 14: Exemple de résultat de BLAST de NCBI des séquences partielles du 16S rDNA (Souche C7)

L'alignement des séquences par BLAST a permis de confirmer l'identification des huit souches. Un pourcentage d'homologie supérieur à 97% entre la séquence d'ARNr 16S étudiée et celles contenues dans les banques des données permet de définir l'espèce bactérienne (Goebel et Stackebrandt, 1994).

Nous avons confronté les données de la caractérisation phénotypique avec celle de la caractérisation génotypique et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Récapitulatif des résultats d'identification phénotypique et génotypique des souches isolées.

Identification		
	Phénotypique	ADNr 16S (BLAST –NCBI)
V1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
V2	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
V3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	/
V4	<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	/
V5	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
V6	<i>Lactobacillus animalis</i>	
V7	<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i>	/
V8	<i>Pediococcus parvulus</i>	/
C1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
C2	<i>Lactobacillus animalis</i>	/
C3	<i>Pediococcus parvulus</i>	/
C4	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
C5	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
C6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
C7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	/
C10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C11	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
C12	<i>Streptococcus thermophilus</i>	/

1.2.2. Phylogénie des lactobacilles pré-identifiés

Une analyse phylogénétique des lactobacilles pré-identifiés a été menée selon la méthode de Neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987) en utilisant la souche *Bacillus subtilis* comme un groupe extérieur (outgroup) aux groupes de l'analyse (figure 15). L'usage des méthodes génotypiques s'impose comme solution pour révéler le plus précisément possible l'identité de ces bactéries.

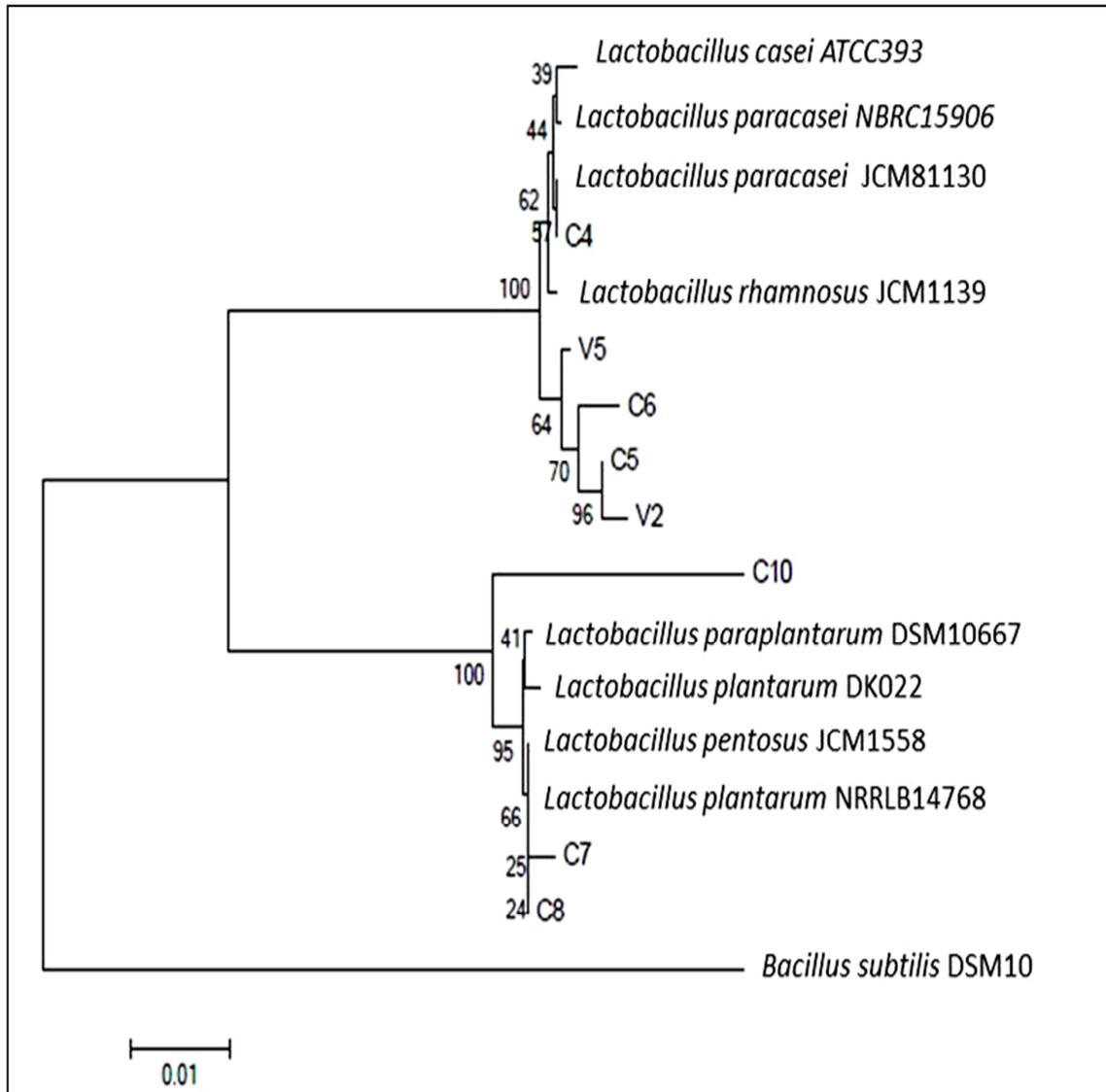


Figure 15 : Arbre phylogénétique des séquences partielles du gène 16S rRNA des souches examinées en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) avec *Bacillus subtilis* comme groupe extérieur (outgroup).

Makarova et *al.* (2006) considèrent que deux isolats bactériens appartiennent à des espèces différentes si la différence de leur G+C est supérieure à 5%. **Toutefois, deux souches ayant le même G+C n'appartiennent pas forcément à la même espèce**, car cette valeur ne prend pas en considération l'arrangement linéaire des nucléotides dans la molécule d'ADN. La disponibilité de génomes complètement séquencés pour l'ensemble des principales familles des lactobacilles a permis la construction d'arbres phylogénétiques dont les degrés de résolution et de robustesse sont élevés.

L'analyse phylogénétique des séquences partielles d'ADNr 16S -700pb- des souches utilisées nous a permis à les affilier à 4 groupes distincts à l'intérieur du genre *Lactobacillus*. La souche **C4** forme un groupe mono phylogénétique avec la souche de référence *Lactobacillus casei* ATCC393 ; tandis qu'elle se rapproche de l'espèce *Lactobacillus paracasei* JCM8130. Le reste des souches **V5, C6, C5, V2** forment un groupe séparé proche de l'espèce *rhamnosus* et *casei*. Ces souches se mettent dans des sous-groupes bien distincts dans la branche de *Lactobacillus casei* ATCC393 et *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136, **ils peuvent constituer, ainsi, de nouvelles espèces dans le genre *Lactobacillus*.**

Sur l'arbre phylogénétique, les souches C7, C8 se retrouvent ensemble dans le groupe composant l'espèce *Lactobacillus plantarum* à une valeur de bootstrap de 95%. Tandis que la C10 se présente séparée par rapport aux souches de référence de *Lactobacillus plantarum* (DK022, JCM1558, 14768).

La détermination de la séquence des gènes de 16S ARNr de *Lactobacillus* fournit une base précise pour l'analyse phylogénétique et l'identification (Vandamme et al., 1996). Bien que la plupart des séquences spécifiques des espèces sont contenues dans la première moitié du gène 16S ARNr, l'identification est généralement plus précise si le gène entier est séquencé (Tannock et al., 1999). Toutefois, il existe quelques limites (Vandamme et al., 1996; Rossello-Mora et Amann, 2001). A titre d'exemple, certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les même séquences de l'ADNr 16S (Fox et al., 1992). L'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S (Intergenic Spacer Region = ITS) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr 16S lui-même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb.pentosus* et *Lb. pseudoplatantum* ou *Lb.rhamnosus* et *Lb.casei* peuvent être discriminées (Berthier et Ehrlich, 1998; Tannock et al., 1999).

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'apprécier, malgré le nombre restreint des souches identifiées, la diversité des lactobacilles présents dans le lait cru. Cette modeste contribution, participe à ouvrir un autre axe de recherche portant sur ces souches originales qui peuvent avoir un équipement génétique particulier.

1.3. Caractérisation technologique

Les résultats de différentes propriétés technologiques sont présentés dans le tableau 9.

1.3.1. Production d'arômes

Le test de Voges-Proskauer réalisé nous a permis l'identification des espèces aromatiques. Un VP+ signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylène glycolique (Zourari et *al.*, 1992; Guessas, 2006). La majorité des souches étudiées ont la capacité de produire l'acétoïne (tableau 9).

L'usage du citrate par certaines bactéries lactiques joue un rôle important dans la production des composés d'arômes d'un grand nombre de produits laitiers fermentés. L'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (Tamime, 1990). Le diacétyl (2,3 butanedione) est métabolisé partir du citrate ou de pyruvate par certaines *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* spp (Holzapfel, 1995). La possibilité de synthèse de diacétyl à partir du citrate est caractéristique de certaines souches de bactéries lactiques entrant dans la composition des cultures de démarrage. Il est l'un des composés les plus importants qui affectent l'arôme des produits laitiers, en leur donnant la saveur analogue à celle du beurre (Madera et *al.*, 2003). Il possède également une activité antimicrobienne plus importante contre les Gram-, les levures et moisissures comparativement aux bactéries Gram+ (Dacosta, 2000).

1.3.2. Recherche et quantification des EPS

La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (Walling et *al.*, 2001). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS comme ferments lactiques lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Les EPS présentent également des effets fonctionnels et bénéfiques pour la santé (Patricia et *al.*, 2002; Welman et Maddox, 2003).

La quantification des EPS produits a porté sur les espèces présentant des résultats positifs sur la gélose hypersaccharosée. L'ensemble des résultats est illustré dans le tableau 9. Ce test a montré que toutes les souches étudiées, à l'exception de *Pc. parvulus* C3, *Lb. animalis* V6, *Lc.lactis* subsp. *lactis* C11, *Lb.plantarum* C7 et *Lb. acidophilus* C9, sont capables de se développer sur un milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect plus ou moins

gluant témoignant une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides. La quantité la plus élevée des EPS produite est de 4,13g/L pour *Lb.casei* V2 suivie par V4 avec 3,77g/L.

Looijesteijn et *al.* (2001) ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents. Ces auteurs ont pu identifier des souches productrices d'EPS (très fortement) et des souches non productrices sans que ce caractère n'engendre des disparités de croissance. Aslim et *al.* (2006) ont observé que la quantité d'EPS produite par des lactobacilles lors de la croissance en milieu MRS était comprise entre 21 et 211 mg/L alors que les streptocoques en produisent entre 16 et 114 mg/L en milieu M17.

Tableau 9: Différentes propriétés technologiques des souches isolées.

Espèces	Evaluation du test	Quantité des EPS (g/l)	VP	lipolyse		protéolyse
				Lps	Lcn	
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> V ₁	+	1.48	-	+	+	+
<i>Lb.casei</i> V ₂	+	4.13	+	+	+	+
<i>Ln.pseudomesentéroides</i> V ₃	+	3.26	+	+	+	+
<i>Lb.delbruckii</i> subsp. <i>lactis</i> V ₄	+	3.77	+	-	-	+
<i>Lb.casei</i> V ₅	+	2.46	+	-	-	+
<i>Lb. animalis</i> V ₆	-	-	+	-	-	+
<i>Lb. delbruckii</i> subsp <i>delbruckii</i> V ₇	+	3.29	-	-	-	+
<i>Pc.parvulus</i> V ₈	+	1.47	-	-	-	+
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C ₁	+	1.34	-	+	+	+
<i>Lb.animalis</i> C ₂	+	0.91	+	-	+	+
<i>Pc. parvulus</i> C ₃	-	-	-	-	-	+
<i>Lb.casei</i> C ₄	+	1.56	+	-	-	+
<i>Lb.casei</i> C ₅	+	0.93	+	-	-	+
<i>Lb. paracasei</i> C ₆	+	1.12	+	-	-	+
<i>Lb. plantarum</i> C ₇	-	-	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i> C ₈	+	1.43	+	+	+	+
<i>Lb. acidophilus</i> C ₉	-	-	+	-	-	+
<i>Lb.plantarum</i> C ₁₀	+	2.88	+	+	+	+
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C ₁₁	-	-	-	-	+	+
<i>St.thermophilus</i> C ₁₂	+	2.01	+	+	+	+

+ :Test positif, - :test négatif, EPS : exopolysaccharides, VP :Voges Proskawer, Lps : lipases, Lcn : lécithinases

Les EPS jouent un rôle principal dans la production de produits laitiers fermentés, en particulier la production du yaourt (Duboc et Mollet, 2001). Ils contribuent de manière significative à la texture, la rhéologie, l'effet dans la bouche, la sensibilité gustative et la stabilité des produits finaux (Welman et Maddox, 2003). Cependant, la rhéologie des produits laitiers fermentés dépend non seulement de la quantité des EPS présents, mais également de la

structure et de la masse moléculaire du polymère et l'état physique des protéines, en particulier les caséines (Hassan *et al.*, 2003; Petry *et al.*, 2003).

En se basant sur les caractéristiques des EPS produits par les bactéries lactiques, ces molécules peuvent être employées en tant qu'additifs naturels dans la fabrication des produits alimentaires et peuvent devenir une alternative aux additifs d'origine chimique, végétal ou bien animal utilisés comme agents stabilisateur, épaississeur, gélifiant ou agents de liaison d'eau (De Vuyst et Degeest, 1999). Cependant, l'implication de ces molécules à l'état pur n'a pas été encore étudiée et jusqu'à présent, les conclusions concernant leur rôle texturant sont indirectes (Badel et Michaud, 2011).

Outre les propriétés technologiques, les EPS produits par les bactéries lactiques sont connus par leurs effets anti-inflammatoire, immuno-stimulateur, anti-tumorale et anti-ulcère et sont prétendus à abaisser le cholestérol sanguin et joue le rôle des prébiotiques (Ruas-Madiedo *et al.*, 2001; Vinderola *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2008).

1.3.3. Lipolyse

Il apparaît que la plupart des souches ne présentent pas une activité lipolytique à l'exception de V1, V2, V3, C1, C7, C8, C10 et C12 qui se sont révélées positives en formant des halos opaques autour de colonies, liés à la précipitation des acides gras sous forme de sels de calcium (tableau 9). Les bactéries lactiques sont peu lipolytiques, bien que quelques espèces possèdent des lipases et/ou des estérases qui sont capables d'hydrolyser des matières grasses du lait (Morais, 2004).

1.3.4. Mise en évidence de la protéolyse

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire. Les peptides issus de la protéolyse sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en acides aminés et en peptides courts (Yvon, 2006).

L'hydrolyse des caséines du lait modifie la texture et les acides aminés et les peptides libérés sont des précurseurs des composés responsables de l'arôme des produits fermentés. L'activité protéolytique est également une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait, ce milieu étant déficient en sources azotées disponibles. Elle était reconnaissable par la présence

d'un halo clair autour des colonies sur la gélose MRS additionné de lait écrémé (Thapa et *al.*, 2006).

1.3.4.1. Sur milieu MRS au lait

L'activité protéolytique des cellules bactériennes a été recherchée pour toutes les bactéries. Cette activité est confirmée pour toutes les souches par l'apparition d'un halo clair autour des puits creusés dans le milieu MRS au lait après 24 heures d'incubation. Elle est évaluée par mesure du carré du diamètre de zone, exprimée en mm², comme décrit par Chantawannakul et *al.* (2002).

Les résultats obtenus montrent que toutes les espèces présentent une capacité importante à dégrader les caséines présentes dans le milieu de culture utilisé et selon les souches, avec des zones de lyse enregistrées allant de 169 mm² à 625mm² (figure 16). Selon Vuillemand, (1986) la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm.

1.3.4.2. Dans les surnageants des cultures

L'activité enzymatique des protéases extracellulaires se manifeste par l'apparition des zones autour des puits creusés sur milieu Agar- lait. Les résultats trouvés indiquent qu'il y a une variabilité du pouvoir protéolytique entre les différentes souches même à l'intérieur de la même espèce (figure 16). Les souches de *Lb. casei* **V5** et **V2** expriment la meilleure activité protéolytique, même par rapport aux deux souches C4 et C5 appartenant à la même espèce. Le même comportement a été observé chez les souches de *Lb. plantarum* dont **C7** est jugée la plus protéolytique.

La technique de gélose au lait écrémé a été utilisée pour examiner qualitativement l'activité protéolytique des isolats. La protéolyse a été observée par la production des halos clairs, après 24h d'incubation, autour des colonies. La taille de la zone claire dans la gélose au lait écrémé indique l'étendue des protéinases produites des souches (Pailin, 2001).

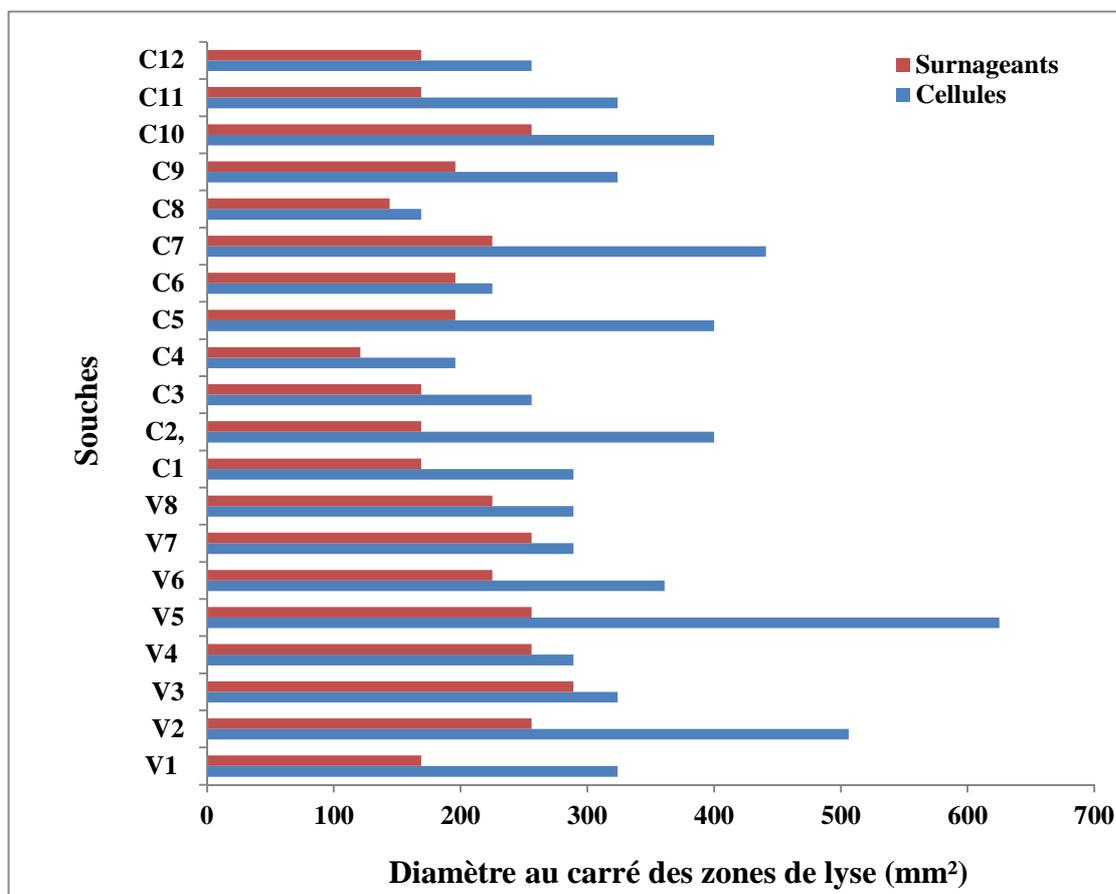


Figure 16: Activité protéolytique des cellules et des surnageants (mm²) des isolats lactiques

Ces résultats nous permettent de confirmer le caractère protéolytique des bactéries lactiques comme il a été rapporté par les travaux de Shirai et *al.* (2001) et François et *al.* (2007). Ces auteurs ont montré que les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe.

De même, nos résultats semblent similaires à ceux obtenus par Roudj et *al.* (2009) qui ont montré que les deux souches de lactobacilles BH14 et CHTD27 isolées de lait camelin du sud ouest Algérien possèdent une bonne activité protéolytique avec des clarifications de 400 et 484 mm² pour les cellules entières et 289, 324 mm² respectivement, pour les surnageants après 48heures d'incubation.

Djellouli, (2010) avait noté des diamètres importants pour les souches CHM18 (625mm²), CHM16 (676 mm²), CHM19 (576 mm²) et CHM20 (625mm²); alors que Messaoui, (2013) a enregistré des diamètres plus importants pour les mêmes souches avec 676 mm² pour CHM18 et 729 mm² pour les autres. Le même auteur a trouvé que les isolats BH et CHTD ont exprimés des activités exocellulaires relativement basses avec un diamètre de 121 mm² (BH14, BH21, CHTD27) et 81 mm² pour la souche CHTD29 et qui représente la valeur la plus faible observée après 48h d'incubation.

Latreche, (2016) a trouvé des diamètres de protéolyse entre 9 et 50 mm, après cinq jours d'incubation sur milieu PCA au lait écrémé, de dix souches lactiques isolées à partir du beurre cru.

1.3.5. Mise en évidence de la relation entre le pouvoir acidifiant et la production des protéases

Cette partie a été consacrée aux souches identifiées phénotypiquement et génotypiquement. Comme il a été mentionné ci-dessus, nous avons pu identifier huit lactobacilles dont quatre appartenant à *Lb. casei* V2, V5, C4 et C5, une à *Lb. paracasei* C6 et trois appartenant à *Lb. plantarum* (C7, C8 et C10).

Le facteur déterminant dans le développement des textures et des caractéristiques organoleptiques des fromages est le potentiel enzymatique des souches utilisées comme des cultures starters dans la fabrication du fromage. Les cultures lactiques jouent un rôle crucial au début de la fermentation, en développant l'acidité et favorisant la coagulation. En outre, elles sont impliquées dans la maturation et le développement de l'arôme des fromages (Delgado et al., 2010).

Dans tous les produits laitiers, la production rapide d'acide lactique par les bactéries lactiques au début de la fermentation est une étape cruciale pour obtenir des produits avec de bonnes propriétés sensorielles et hygiéniques. La production rapide d'acide lactique par les souches de bactéries lactiques dépend de leur système protéolytique, la capacité de métaboliser le lactose et la résistance des bactéries au stress acide (Galia et al., 2009). Par conséquent, les activités acidifiantes et protéolytiques des isolats de produits laitiers sont très importantes pour leur sélection dans les cultures starters.

En fait, une souche lactique pour être considérée comme un bon candidat pour l'inclusion comme un démarreur, elle devrait produire suffisamment d'acide pour réduire le pH du lait à des valeurs inférieures à 5,3 après 6 h d'incubation dans le lait à 30°C (Beresford *et al.*, 2001).

La capacité acidifiante des huit souches de bactéries lactiques testées a été déterminée au bout de 6, 12 et 24 h d'incubation à 30°C.

Dans notre étude, tous les lactobacilles testés ont montré une capacité de réduire le pH à des valeurs inférieures à 6 (entre 5,43 et 4,55) après 6 heures d'incubation et peuvent coaguler le lait écrémé après 24h d'incubation (tableau 10).

Tableau 10 : Activité acidifiante de 8 lactobacilles après 6 et 24 heures d'incubation.

Souches	Temps d'incubation (h)			
	6h		24h	
	pH	acidité titrable (g 100 mL ⁻¹)	pH	acidité titrable (g100 mL ⁻¹)
<i>Lb.casei C4</i>	4,97±0.017	0.6±0.10	4,20±0.000	1.1±0.10
<i>Lb.casei C5</i>	4,97±0.00	0.6±0.10	4,52±0.068	0.95±0.50
<i>Lb.paracasei C6</i>	4,55±0.050	0.59±0.10	4,36±0.005	0.90±0.10
<i>Lb.plantarum C7</i>	5,43±0.025	0.50±0.10	4,24±0.052	1.11±0.17
<i>Lb.plantarum C8</i>	4,75±0.043	0.60±0.10	4,52±0.028	0.99±0.11
<i>Lb.plantarum C10</i>	4,85±0.043	0.46±0.10	4,50±0.005	0.89±0.05
<i>Lb.casei V2</i>	5,40±0.005	0.57±0.05	4,49±0.005	1.04±0.55
<i>Lb.casei V5</i>	4,99±0.005	0.6±0.10	4,45±0.113	1.03±0.57

Bien qu'il y ait des variations dans la production d'acidité entre les souches de ces espèces, ces différences sont devenues plus marquées au cours du temps, avec des valeurs allant de 0,89 à 1,11g100 mL⁻¹ d'acide lactique après 24 h d'incubation, en fonction de la souche (p <0,05). Ayad *et al.* (2004); Dagdemir et Ozdemir, (2008) et Gonzalez *et al.* (2015) ont montré qu'il y a une variation dans les valeurs du pH entre les souches à l'intérieure de la même espèce et ont classé les souches de bactéries lactiques étudiées comme étant rapide ou lente par rapport à leur pouvoir acidifiant. Les souches utilisées dans cette étude peuvent être

adaptées pour leur sélection dans les cultures starters (ou cocultures) du fromage. De façon plus générale, bien que la diversité des espèces dépende du type de fromage, les lactobacilles mésophiles les plus fréquemment rencontrées sont *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. curvatus* (Beresford et al., 2001).

Les bactéries lactiques sont des organismes exigeants. Pour une croissance optimale, elles dépendent de la présence de petits peptides et acides aminés libres dans le milieu de culture. Etant donné que la concentration d'acides aminés et de peptides libres présents dans le lait ne suffit pas pour la croissance des bactéries lactiques, ces bactéries doivent être capables de dégrader les protéines du lait ; cela constitue la base de leur utilité dans l'industrie laitière. La dégradation de la caséine et de l'utilisation ultérieure des produits de dégradation protéolytique nécessite un système complexe constitué de protéinases, des peptidases et des acides aminés et des transporteurs de peptides (Tsakalidou et al., 1999). Les résultats obtenus pour le dosage de l'activité protéasique des huit souches testées sont présentés dans la figure 17.

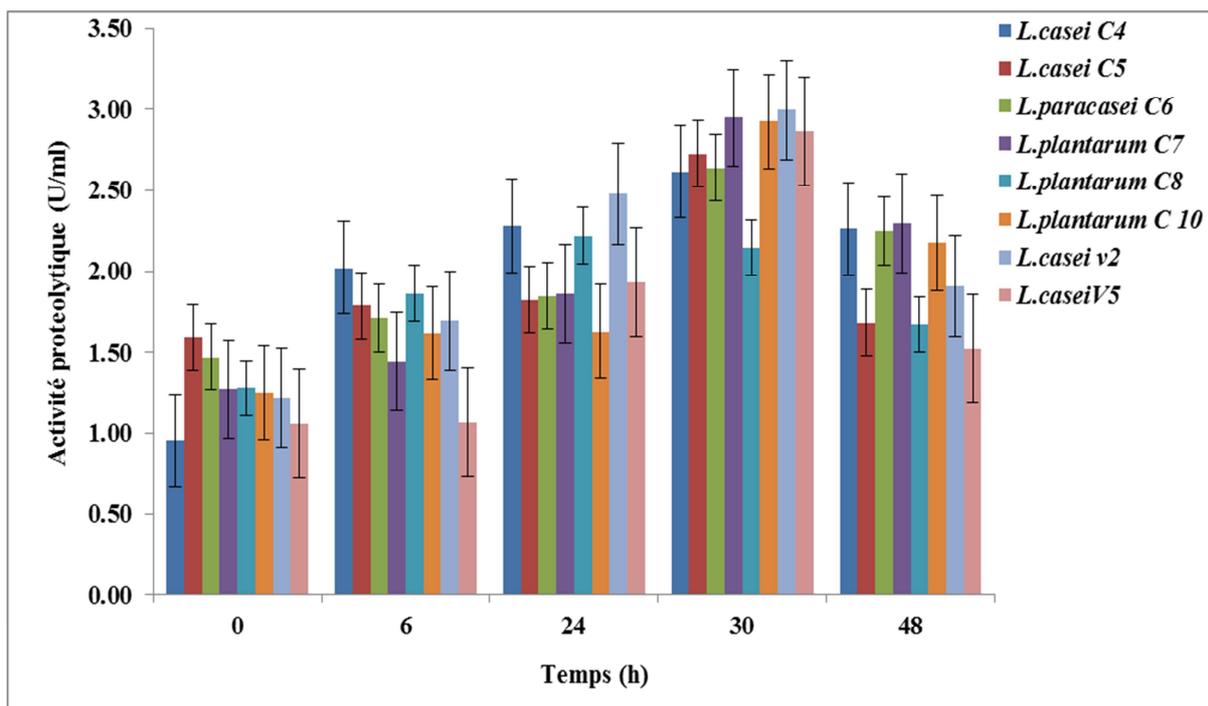


Figure 17: Evolution de l'activité protéolytique (Unités/mL) des souchesensemencées dans le bouillon MRS à 37°C.

Les résultats indiquent que la plupart des souches produisent activement les protéases extracellulaires dans la phase stationnaire précoce de la croissance cellulaire. Les activités les plus élevées ont été trouvées entre 24 et 30 heures, à titre d'exemple, *Lactobacillus casei* V2 a atteint un taux de 2,48 et 3,00 U/mL après 24 et 30 heures d'incubation respectivement. Mêmes résultats ont été trouvés par Kholif et al. (2011). Il a été également mentionné par Kawai et al. (1999) et Wang et al. (2007) que l'activité de la protéase maximale (0,14 U/mL) est apparue au début de la phase stationnaire.

L'analyse de corrélation des données présentées ici suggèrent qu'il y avait une faible relation non significative entre les activités protéolytique et acidifiante ($p = 0,3$). Certaines études sur les Lactobacilles confirment ces résultats (Fontina et al., 1998; Hassaine et al., 2008; Gonzalez et al., 2015). La variabilité des performances technologiques des souches provenant de sources naturelles n'est pas surprenante (Gatti et al., 1999; Giraffa et al., 2004).

Conclusion de la première partie

Le cheptel algérien est peu connu et les races locales constituent un patrimoine génétique à sauvegarder (Badis, 2004). Le lait cru est riche en souches de bactéries lactiques avec de nouvelles propriétés (Wouters et al., 2002 ; Franciosi et al., 2009). Notre premier objectif, d'une telle collecte, était d'apprécier la diversité de la flore de bactéries lactiques présentes dans les laits crus des différentes populations locales (de vache et de chèvre) afin de mettre en place des souches performantes. A cet effet, les souches étudiées dans notre travail, avec leurs aptitudes technologiques distinctes, peuvent être un outil bien adapté à la production de nouveaux produits laitiers avec des propriétés physicochimiques et sensorielles différentes par leur contribution à l'acidification et la protéolyse du lait et à la formation d'arômes et de saveurs en raison de leurs activités enzymatiques variées.

2. Mise en évidence, *in vitro*, de quelques propriétés probiotiques

Les progrès effectués dans la connaissance des bactéries lactiques ont mis en évidence une grande diversité d'espèces et de souches, ainsi qu'un très large éventail de propriétés allant bien au-delà du potentiel acidifiant. Ainsi deux souches d'une même espèce peuvent manifester des propriétés extrêmement différentes. A cela, s'ajoutent d'autres facteurs plus spécifiques du contexte industriel. C'est le cas des associations de plusieurs souches, réalisées afin de constituer des ferments susceptibles de générer l'ensemble des propriétés requises pour l'élaboration d'un produit (Corrieu et Luquet, 2008). Les ferments se composent d'un mélange défini de cultures pures ou d'un mélange non défini de différents types de bactéries (Cogan, 1996; Law et Handrikman, 1997).

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités (Cholet, 2006; Monnet et *al.*, 2008). Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques par leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et animale.

D'un point de vue technologique et afin d'être considérées comme de potentiels probiotiques, les souches sélectionnées doivent montrer une capacité à survivre dans des milieux à forte concentration en bile et à faibles valeurs de pH, à détenir des propriétés particulières de colonisation, *in vitro*, et à être capables d'interagir avec l'hôte (Ebel, 2012).

Dans cette partie de notre travail, nous avons choisi quatre cultures mixtes (deux thermophiles et deux mésophiles) pour étudier d'une part les propriétés probiotiques que possèdent les souches, et d'autre part de mettre en évidence l'effet des interactions entre les candidates une fois mises en contact afin de sélectionner les meilleures cultures ayant des fonctionnalités plus importantes et dans une perspective d'une éventuelle utilisation.

Cette recherche s'est intéressée principalement à l'étude de l'aspect sécuritaire des souches via leur activité hémolytique et leur résistance aux antibiotiques, de la résistance des différentes cultures (mixtes et pures) aux conditions gastriques (acidité et sels biliaires), à leur adhésion (hydrophobicité) et leur activité antibactérienne contre des germes pathogènes.

2.1. Aspect sécuritaire

Les souches probiotiques doivent être dépourvues de pouvoir hémolytique et de résistance aux antibiotiques à caractère transmissible (Salyers et *al.*, 2004).

L'activité hémolytique a été recherchée sur gélose au sang. Ce milieu est utilisé pour la détection et la détermination des caractéristiques hémolytiques d'une souche bactérienne donnée. Les zones d'hémolyse se manifestent comme suit : β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zone avec reflets verdâtres) ou γ hémolyse (le milieu n'est pas modifié). Aucune zone d'hémolyse n'a été observée autour des colonies. Toutes les souches étudiées ne sont pas hémolytiques. Les bactéries lactiques sont considérées comme inoffensives, donc sans danger pour l'homme (Gueimonde et *al.*, 2004).

L'autre aspect important de la sécurité sanitaire des probiotiques destinés à l'Homme est le profil de la résistance aux antibiotiques. En effet, comme pour toutes les bactéries, les souches probiotiques ont montré une résistance aux antimicrobiens (Salminen et *al.*, 1998). Dans ce contexte, il est recommandé d'étudier le profil de résistance des probiotiques pour les antibiotiques (FAO/OMS, 2002). Pour l'antibiorésistance de nos souches lactiques, les résultats sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résistance des souches aux antibiotiques

	Oxacilline (OX)	Vancomycine (VA)	Amoxicilline(AMC)	Rifampin (RA)	Ciprofloxacine (CIP)	Gentamicine (CN)	A. nalidixique (NA)
<i>Lb.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> V1	R	S	S	S	R	S	R
<i>Lb.casei</i> V2	R	R	R	R	R	S	R
<i>Lb.delbruckii</i> ssp. <i>lactis</i> V4	R	S	S	S	R	S	R
<i>Lb.casei</i> C5	R	R	R	S	R	R	S
<i>Lb. plantarum</i> C7	R	S	R	S	R	S	S
<i>St. thermophilus</i> C12	R	R	R	S	R	S	R
<i>Ln.pseudomesentéroïdes</i> V3	R	R	R	R	R	S	R
<i>Lb.plantarum</i> C10	R	R	R	S	R	S	R
<i>Lb.plantarum</i> C8	R	S	R	S	R	S	S
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C1	R	S	R	S	R	S	R
<i>Pc.parvulus</i> C3	R	R	R	R	R	S	R

D'une façon générale, les souches étudiées ont montré un comportement différent à l'égard des antibiotiques testés. Cependant, nous avons constaté une résistance totale à l'Oxacilline et à la Ciprofloxacine (CIP). Certaines se sont montrées résistantes à l'acide nalidixique (NA) et à la Rifampin (RA). Pour la Gentamicine, les souches étaient sensibles à cet antibiotique sauf *Lb. casei* C5. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par Koll et al. (2008). Contrairement, certains chercheurs ont signalé des cas de résistances de *Lactobacillus* à cet antibiotique (Charteris et al., 1998; Coppola et al., 2005).

La résistance à certains antibiotiques est largement décrite chez les bactéries lactiques et elle est généralement considérée comme intrinsèque et non transférable (Mathur et Singh, 2005).

La résistance naturelle des bactéries lactiques à une gamme d'antibiotiques cliniquement importants permet leur utilisation comme probiotiques «sûrs» ou leur emploi en thérapie de combinaison, antibiotique / probiotique, contre les infections bactériennes. En effet, de récentes études ont été menées sur les probiotiques, en combinaison avec des antibiotiques, comme une alternative à l'antibiothérapie chez l'Homme, en raison de l'émergence et l'augmentation des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Borriello et al., 2003; Rishi et al., 2011).

2.2. Résistance à l'acidité et aux sels biliaires

La survie des bactéries aux conditions du tube digestif est un critère incontournable de sélection de souches probiotiques (FAO/WHO, 2006). Cependant, c'est une fonction complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes permettant aux bactéries de survivre à des environnements successifs très divers (pH bas, présence de sels biliaires) (Turpin, 2011).

L'ensemble des cultures ont donné une bonne croissance sur le milieu témoin pH 6.5 (taux de survie est supérieur à 100%). La résistance aux conditions acides diminue avec la diminution du pH du milieu jusqu'à atteindre un minimum de $55 \pm 1\%$ de viabilité enregistré par la souche *St. thermophilus* C12 à pH 2. *Lb. plantarum* C7 a montré une meilleure résistance à un faible pH, suivi par C8, C5 et les cultures qui les composent (figure 18).

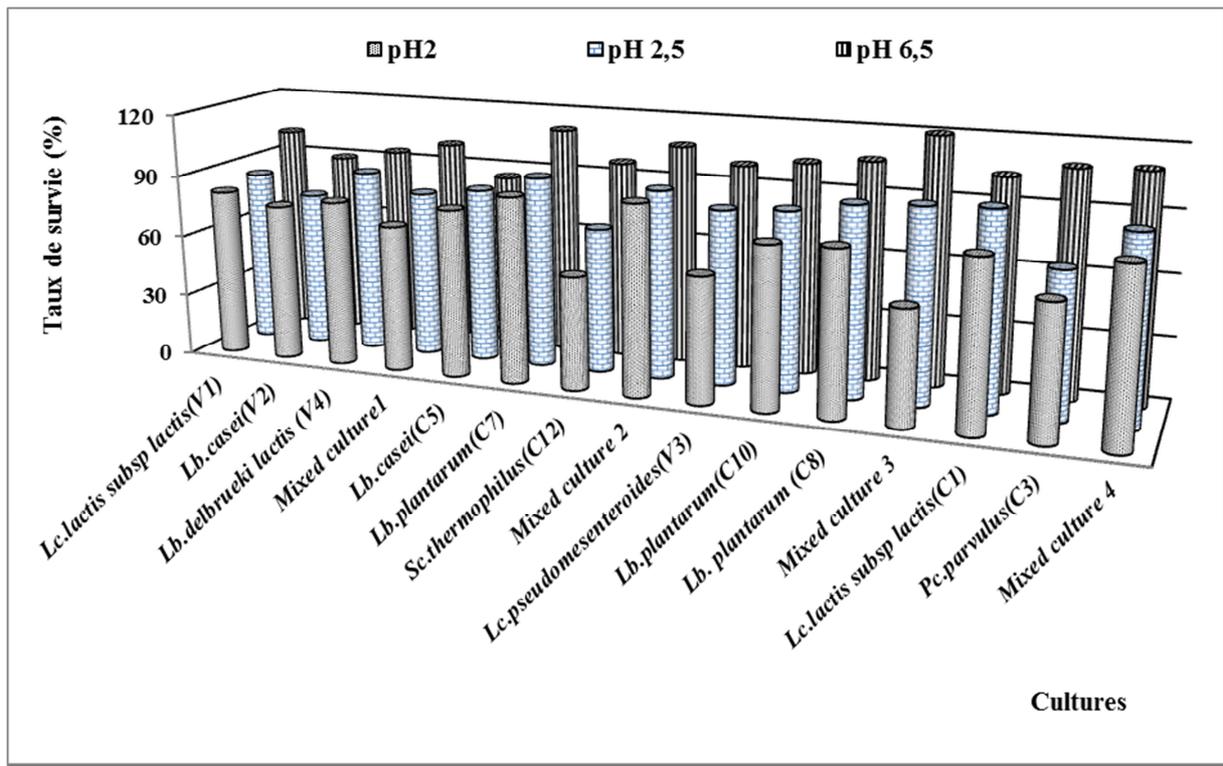


Figure 18: Résistance des différentes cultures aux milieux acides.

Il apparaît que toutes les cultures ont présenté une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaires et à différents milieux acides. À pH 2,5, le taux de survie a diminué pour atteindre $65,66 \pm 2,08\%$ pour *Pc. parvulus* C3. La différence entre les souches était significative ($P > 0.05$). Alors qu'à pH 2, aucune réduction significative n'a été observée du taux de survie par rapport à pH 2,5 et même entre l'ensemble des souches pures et des cultures mixtes, à l'exception des souches *Lc. lactis* subsp. *lactis* V1 et C1, et *Pc. parvulus* C3 où leur viabilité a diminué d'une façon significative d'un pH 2,5 à pH 2 (figure 19).

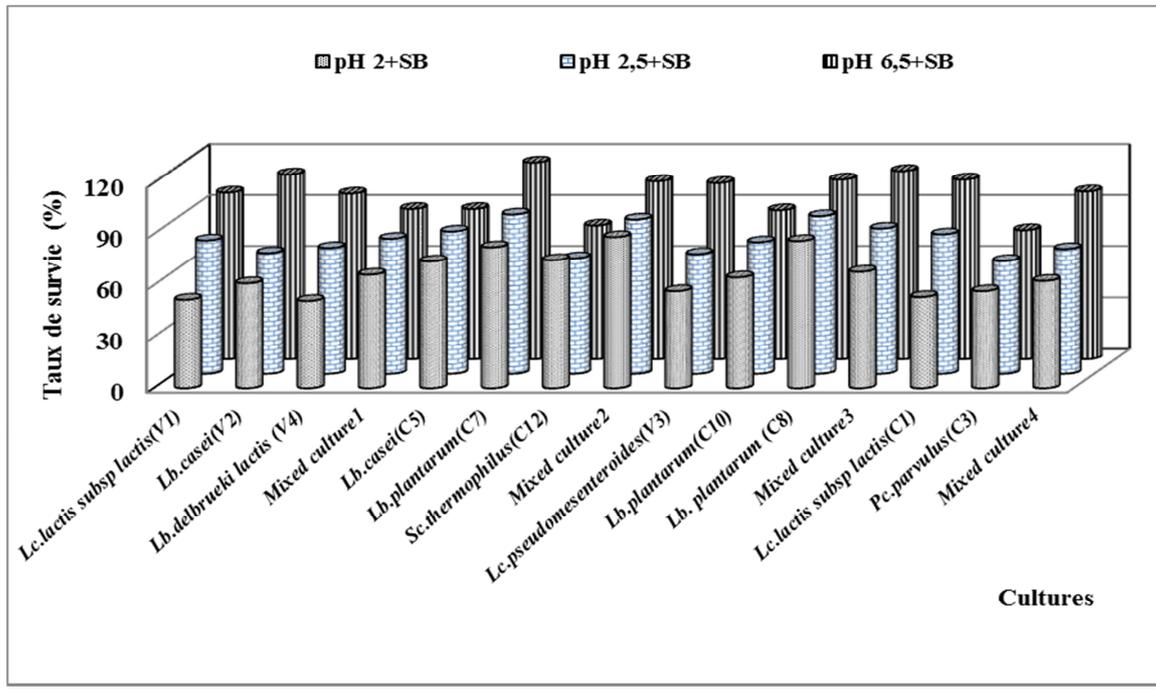


Figure 19: Résistance des différentes cultures aux sels biliaries à 0,3%.

Il faut noter que l'association des souches n'a pas d'effet significatif sur l'augmentation de la chance de survie des bactéries lactiques testées dans des milieux acides et en présence de sels biliaries, mais la résistance reste importante (supérieure à 62%), ce qui rend possible le passage vivant de ces cultures dans le tractus digestif. D'autre part, nous avons remarqué que la souche *Lb.plantarum* C7 suivie par la culture dont laquelle fait partie (CM2) ont atteint les meilleurs taux de résistances vis à vis des pH bas et la concentration élevée en sels biliaries (0,3%). Même résultat a été trouvé par Bahri, (2014) qui a montré que le taux de résistance le plus élevé à pH 1 a été observé avec la souche *Lb. plantarum* F12 avec une bonne tolérance aux sels biliaries (0,3%). Plusieurs études ont montré que des souches d'origine humaine appartenant aux espèces : *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* et au groupe *Lb. casei* possèdent une tolérance aux conditions stomacales (Dunne et al., 2001; Lim et al., 2000; Lorca et al., 2002; Khalil et al., 2007; Xiaodong et al., 2009; Kirtzalidou et al., 2011).

Les travaux de Mathara et al. (2008) ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus sp* vis-à-vis des pH 2,5 et pH 2 après 2h d'incubation. Plusieurs études ont montré que diverses souches appartenant aux espèces : *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei.sp*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus* possèdent une tolérance aux conditions du suc gastrique (Dunne et al., 2001; Lim et al., 2000; Lorca et al., 2002; Khalil et

al., 2007; Xiaodong et *al.*, 2009; Kirtzalidou et *al.*, 2011). De même, Dib et *al.*, (2012) ont enregistré une viabilité allant jusqu'à 93% à pH 3 des isolats *Leuconostoc mesenteroides spp. dextranicum* (JD1 et JD3) de Jebn Darfiyeh. Servin, (2004); Tejero-Sarinena et *al.* (2012) ont montré que la compétitivité bactérienne des lactobacilles en milieu acide est avantagée par rapport aux autres bactéries à cause de leur tolérance à l'acidité. Sadi, (2006) a montré que les souches pures mésophiles de *Lactobacillus paracasei* présentent un taux de survie meilleur à pH 4,3.

Les lactobacilles sont capables de métaboliser les acides biliaires ce qui les protègent contre la bile. L'un des mécanismes de cette résistance; c'est la déconjugaison des acides biliaires par les enzymes *biles salts hydrolase* (BSH). L'hydrolyse libère les glycines et/ou les taurines du noyau stéroïde ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à pH bas et de réduire ses activités détergentes (Begley et *al.*, 2006; Hamon et *al.*, 2011). Cette capacité permettait de detoxifier les sels biliaires ce qui augmenterait la survie et la persistance intestinale des souches productrices les rendent ainsi robustes face aux conditions extrêmes régnant dans le tractus gastro-intestinal (De Smet et *al.*, 1998). La sélection de souches possédant une grande tolérance à l'acidité est très intéressante pour l'industrie agro-alimentaire (Ebel, 2012).

2.3. Test d'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des différentes cultures vis-à-vis du xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des ferments aux mucus intestinal. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les pourcentages obtenus de l'adhérence des souches pures et des cultures mixtes au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont illustrés par la figure 20.

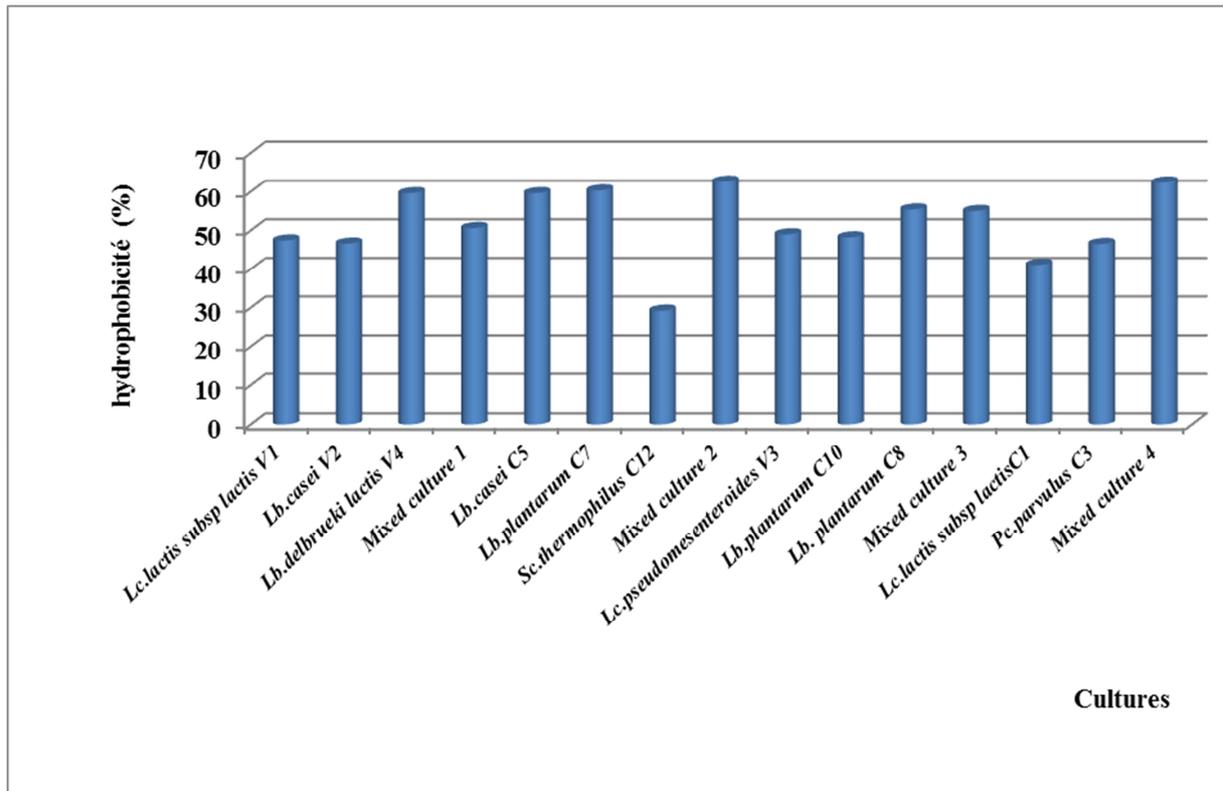


Figure 20 : Hydrophobicité des cultures vis-à-vis le Xylène.

Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent adhérer aux cellules épithéliales ou au mucus intestinal et persister dans l'intestin (Collado *et al.*, 2005; Xiaodong *et al.*, (2009). Ces résultats montrent que presque la totalité cultures mises au test présentent une bonne hydrophobicité, cela témoigne d'une bonne sélectivité des surfaces membranaires. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées avec les souches pures de *Lb. plantarum* C7, C8 et *Lb.casei* C5 suivies par leurs cultures mixtes CM2 et CM3. Cependant, nous avons enregistré un taux plus faible de $29.19\% \pm 2.30\%$ par la souche *St. thermophilus* C12. La différence enregistrée entre les souches pures et les cultures mixtes est significative ($P < 0.05$).

Bahri, (2014) a trouvé que la souche *Lb. plantarum* F12 a présenté la plus forte adhésion aux cellules Caco-2. Menad *et al.*, (2014) ont trouvé une hydrophobicité de 45 % pour *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CNRZ 107. L'hydrophobicité de plusieurs souches de *Lc. lactis* d'origine laitière a été évaluée par Giaouris *et al.* (2009) qui ont trouvé des valeurs qui oscillaient entre 5% et 88%.

Par ailleurs, Dilmi-Bouras, (2002) a prouvé dans son étude, *in vivo*, que les deux ferments du yaourt YB3 n'adhèrent pas à l'épithélium intestinal du lapin et l'absence de l'implantation de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* n'est cependant pas incompatible avec une activité probiotique.

2.4. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'un probiotique est primordiale pour la colonisation réussie des muqueuses intestinales. Elle lui assure un effet de barrière et de défense contre les pathogènes (Vaughan et al., 1999). L'étude des bactéries lactiques autochtones permet de sélectionner les meilleurs candidats pour améliorer la sécurité microbiologique des produits alimentaires traditionnels et peut augmenter leur durée de conservation (Mezaini et Dilmi Bouras, 2013).

Les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (Aslam et Qazi., 2010).

Lors d'expériences, *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. Ainsi, Gopal et al. (2001) ont mené une série d'expériences pour étudier l'inhibition, *in vitro*, d'une souche d'*E. coli* entérotoxigène par *Lb. rhamnosus* DR20, *Lb. acidophilus* HN017 et *Bifidobacterium lactis* DR10.

Le tableau 12 présente les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des souches testées et leurs associations (CM1, CM2, CM3 et CM4) qui ont montré que leurs cultures d'une nuit ont eu une forte activité antagoniste contre les bactéries pathogènes indicatrices.

Il est intéressant de noter que l'antagonisme le plus prononcé observé dans cette étude est le résultat d'une symbiose entre *Lb. casei* C5, *Lb. plantarum* C7, *St.thermophilus* C12 de la culture mixte CM2 suivie par celle de *Lc. pseudomesentéroides* V3, *Lb. plantarum* C10 et *Lb. plantarum* C8 de la culture mixte CM2. Donc, l'une de ces souches peut exercer un effet inhibiteur plus marqué que celui des autres. Il faut également signaler que *N. gonorrhoeae* était la souche la plus résistante. Cependant, elle a montré une nette sensibilité vis à vis *Lb. casei* C5, *Lb. plantarum* C10 et *Lb. plantarum* C8.

Tableau 12: Activité antibactérienne des souches pures et les cultures mixtes et sur les germes indicatrices (mm).

Cultures	Zone d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> V1	++	-	-	++
<i>Lb.casei</i> V2	+++	+++	++	+++
<i>Lb. delbruckii</i> ssp. <i>lactis</i> V4	++	+++	-	++
CM1 (V1 +V2 +V4)	+++	+++	-	++
<i>Lb. plantarum</i> C5	+++	+++	+++	+++
<i>Lb.plantarum</i> C7	+++	+++	+++	+++
<i>St. thermophilus</i> C12	+++	+++	-	++
CM2 (C5 + C7 + C12)	+++	+++	+++	+++
<i>Ln. pseudomesentéroïdes</i> V3	++	+++	-	+++
<i>Lb. plantarum</i> C10	++	-	-	+++
<i>Lb. plantarum</i> C8	+++	+++	+++	+++
CM3 (V3 + C10 + C8)	+++	+++	+++	++
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C1	++	++	-	+++
<i>Pc. parvulus</i> C3	+++	-	-	++
CM4 (C1 + C3)	+++	+++	+++	++

Aucune inhibition (-); diamètre compris entre 0 et 3 mm (faible, +); diamètre compris entre 3 et 6 mm (bon, ++)
et d'un diamètre supérieur à 6 mm (forte, +++).

La fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien, ce qui confirme la production d'agent(s) antimicrobien(s) par les souches lactiques dans le milieu (tableau 13).

Tableau 13 : Activité inhibitrice des surnageants natifs (mm).

Cultures	Zone d'inhibition (mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>P.aerugenosa</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> V1	11	09	-	08
<i>Lb. casei</i> V2	09	12	-	11
<i>Lb.delbruckii</i> ssp. <i>lactis</i> V4	10	10	-	-
CM1 (V1 +V2 +V4)	12	10	-	08
<i>Lb. casei</i> C5	10	09	11	10
<i>Lb. plantarum</i> C7	08	17	11	11
<i>St.thermophilus</i> C12	08	07	-	06
CM2 (C5 + C7 + C12)	09	14	15	10
<i>Ln. pseudomesentéroïdes</i> V3	09	-	-	09
<i>Lb. plantarum</i> C10	07	-	-	07
<i>Lb. plantarum</i> C8	09	12	10	11
CM3 (V3 + C10 + C8)	09	10	13	08
<i>Lc.lactis</i> C1	09	10	-	07
<i>Pc. parvulus</i> C3	08	07	-	07
CM4 (C1 + C3)	09	12	11	10

Yuksekdag et Beyatli, (2003) ont montré que l'effet antimicrobien de *Lactobacillus* a été plus élevé que celui de *Streptococcus*. Cet effet est dû non seulement à la production d'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène, mais également à d'autres composés antimicrobiens comme les bactériocines.

Toualbia et al. (2016) ont constaté que *Lactobacillus plantarum* a montré la puissance la plus antibactérienne vis-à-vis *Escherichia fergusonii*. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Metlef et Dilmi Bouras, 2009).

Les bactéries lactiques exercent une forte activité antagonistique contre plusieurs microorganismes, y compris ceux de la détérioration des aliments et des microbes pathogènes. En outre, l'effet antimicrobien de quelques souches permet de prolonger la durée de conservation des aliments (Haller, 2001; O'Sullivan et al., 2002). Cet effet est principalement

dû à la production des acides organiques (acide lactique) et également à la production des composés antimicrobiens comprenant le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, l'acétaldéhyde, les isomères des acides aminés et les bactériocines (Cintas et al., 2001).

Mezaini et al. (2009) ont rapporté que parmi les vingt souches de bactéries lactiques isolés d'un lait Algérien et examinées pour leur activité antagonique vis-à-vis de *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermididis*, *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, *St. thermophilus* T2 a montré un spectre d'inhibition large vis-à-vis de toutes les bactéries indicatrices gram positives à l'exception de *S. aureus*. En outre, cette souche n'a montré aucune activité inhibitrice contre *E. coli* et *S. typhimurium*.

Callaway et al. (2008) et Garcia et al. (2010) ont rapporté que les bactéries bénéfiques, principalement les bactéries lactiques et les bifidobactéries peuvent être une stratégie utile et efficace pour empêcher ou réduire l'incidence des microbes pathogènes, de ce fait améliorer l'innocuité des aliments et protéger la santé du consommateur.

Des auteurs ont observé une diminution de l'adhésion de plusieurs bactéries pathogènes avec une relation directe entre la dose de probiotique ajoutée sur le taux de réduction de l'adhésion. Parmi les pathogènes inhibés, on retrouve différents types d'*E. coli* (entérotoxigénique, ETEC; entéropathogénique, EPEC; et diarrhéogénique, DAEC), *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Klebsiella pneumoniae* (Bernet et al., 1993; Coconnier et al., 1993; Forestier et al., 2001).

Conclusion de la deuxième partie

Pour qu'un microorganisme soit reconnu comme probiotique, il faut que son effet bénéfique chez l'Homme, et sa capacité à survivre au transit intestinal soient démontrés (WHO/FAO, 2001; Van de Guchte et al., 2002; AFSSA, 2005; EFSA, 2010). Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L'adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestif leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l'hôte, mais permet également l'exclusion des pathogènes et une immunostimulation (Servin, 2004).

La sélection initiale des souches en utilisant des méthodes *in vitro* reste une étape préliminaire utile dans la détection des candidats probiotiques, malgré les difficultés rencontrées pour caractériser les souches probiotiques fiables de cette manière (Campana et

al., 2012). Toutefois, il est important de noter que chaque souche est unique et les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les microorganismes probiotiques (FAO/OMS, 2002).

La production et la commercialisation des probiotiques à l'échelle industrielle exposent les microorganismes à des conditions défavorables qui peuvent tuer une grande partie des bactéries. Parmi les ressources innovatrices dont on peut se servir pour préserver la viabilité, on compte sur l'application de conditions de stress (température, acidité, etc.) pour induire une réponse d'adaptation qui rend les probiotiques résistants. Entre autres, les nouvelles technologies de séchage, notamment de lyophilisation (freeze drying), exposent les microorganismes à des conditions plus douces et permettent une augmentation substantielle de la viabilité. Si les baisses de viabilité sont inacceptables lors de la fermentation, la lyophilisation, la production de cultures concentrées dans des billes de gel d'alginate ou de carraghénane est une alternative au processus traditionnel (Macouzet et Champagne, 2007).

La biotechnologie moderne offre plusieurs outils qui nous permettraient de mieux caractériser les souches probiotiques afin de rationaliser l'exploitation de leurs activités métaboliques en fabrication de produits laitiers fermentés ou autres aliments fonctionnels. Par exemple, le génotypage de souches de bactéries autochtones ayant un potentiel probiotique et technologique représente une perspective prometteuse pour la valorisation de notre patrimoine biologique et l'amélioration de la qualité des produits alimentaires locaux.

Conclusion Générale et Perspectives

Ce travail nous a permis d'apprécier la flore microbiologique en bactéries lactiques présentes dans le lait cru des populations bovines (brune de l'Atlas) et caprines (Kabyle et Arabia) locales. Une vingtaine d'isolats est caractérisée sur un total de 66 souches isolées et purifiées. En se basant sur les résultats phénotypiques, nous pouvons les inclure dans cinq genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, et *Streptococcus*. Une dominance du genre *Lactobacillus* a été notée. L'identification des souches, basée sur les caractères morphologiques et sur les différents métabolismes biochimiques nous a permis de les rapprocher aux espèces suivantes : *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *St. thermophilus*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis*, *Pc. parvulus*, *Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. animalis* et *Lb. acidophilus*. Il faut noter que l'utilisation des techniques moléculaires permet mieux d'affilier les isolats à leur réel taxon. L'identification moléculaire par le séquençage partiel de 16S rDNA nous a permis d'identifier huit lactobacilles pré-identifiés phénotypiquement. L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir de leurs séquences a démontré leur affiliation à 4 groupes distincts à l'intérieur du genre *Lactobacillus*. Les relations phylogénétiques entre bactéries demeurent un outil très puissant pour une bonne identification et ceci est d'autant vrai, avec l'enrichissement exponentiel des bases de données en séquences du gène 16S rRNA des souches dites de références.

L'évaluation des aptitudes technologiques a mis en évidence l'existence de bonnes fonctionnalités chez les isolats testés : La majorité ont la capacité de produire l'acétoïne et les exopolysaccharides (EPS). La quantité la plus élevée des EPS a été produite par V2 avec 4,13g/L suivie par V7 avec 3,29g/L ; toutes les souches ont exprimé une bonne activité protéolytique avec des zones de lyse allant de 169-625mm² sur MRS au lait. Cependant, ces pouvoirs varient selon la souche, même à l'intérieure de la même espèce. La production la plus élevée des protéases exocellulaires chez les huit lactobacilles identifiés phénotypiquement et génotypiquement a été trouvée entre 24h et 30h dont V2 atteint un taux de 2,48 et 3,00U/mL respectivement. De même, ils ont montré une activité acidifiante appréciable où ils peuvent réduire le pH à des valeurs inférieures à 6 (entre 5,43 et 4,55) après 6 heures d'incubation et peuvent coaguler le lait après 24heures d'incubation.

Au cours de cette thèse, nous avons également estimé le potentiel probiotique de 11 souches avec leurs cultures mixtes (CM1, CM2, CM3, CM4). Elles sont criblées pour leur

tolérance au pH acide et aux sels biliaries, leur hydrophobicité vis-à-vis le xylène et l'antagonisme. L'ensemble des cultures ont donné une bonne croissance sur le milieu témoin pH 6,5 (taux de survie est supérieur à 100%). La résistance aux conditions acides diminue avec la diminution du pH du milieu. *Lb.plantarum* C7 a montré une meilleure résistance à un faible pH (2 - 2,5), suivi par C8, C5 et les cultures qui les composent (CM2 et CM3). Cependant, les cultures ont présenté une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaries (0,3%) et à différents milieux acides.

Les pourcentages obtenus de l'adhérence des souches pures et des cultures mixtes au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrée avec les souches pures de *Lb.plantarum* C7, C8 et *Lb.casei* C5 suivies par leurs cultures mixtes CM2 et CM3.

L'autre critère recherché est l'activité antibactérienne des différentes cultures vis-à-vis des souches pathogènes représentées par : *P. aeruginosa* ; *N. gonorrhoeae*; *K. pneumoniae* ; *E. coli*. La caractérisation de l'agent inhibiteur a permis de déterminer que l'activité antibactérienne des différentes cultures est due à la présence de substances antibactériennes dans le surnageant qui peut être le peroxyde d'hydrogène ou d'autres substances protéiques comme les bactériocines. Il est intéressant de noter que l'antagonisme le plus prononcé observé dans cette étude est le résultat d'une symbiose entre *Lb. casei* C5, *Lb. plantarum* C7, *St.thermophilus* C12 de la culture mixte CM2 suivie par celle de *Lc. pseudomesenteroides* V3, *Lb. plantarum* C10 et *Lb. plantarum* C8 de la culture mixte. Il faut également signaler que *N.gonorrhoeae* était la souche la plus résistante. Cependant, elle a montré une nette sensibilité vis à vis *Lb. casei* C5, *Lb. plantarum* C10 et *Lb. plantarum* C8.

Ce travail nous a permis de caractériser différentes souches ayant des potentialités technologiques et probiotiques très hétérogènes et présumées intéressantes. D'autre part, cette étude contribue par l'apport de certaines connaissances sur la richesse de lait cru des populations caprines et bovines Algériennes. En effet, il constitue une source précieuse de souches naturelles « sauvages » et un réservoir national à grande valeur technologique et fonctionnelle.

En perspectives de ce travail de thèse, la possible utilisation des bactéries lactiques testées pourra être étudiée en d'autres points :

- ✓ **Pousser l'identification génotypique des souches** : Les techniques génotypiques sont indispensables pour une meilleure identification des souches, cependant chacune d'elles a un pouvoir discriminatoire spécifique. L'utilisation des méthodes phénotypique ou génotypique nécessite l'utilisation d'un grand nombre de souches de référence et une très grande base de données qui doit inclure des représentants de toutes les espèces et le maximum de variantes de chaque espèce (souche).
- ✓ **L'utilisation du criblage génétique** pour étudier des fonctions complexes citant à titre d'exemple :

* la production de peptides bioactifs : certaines souches de bactéries lactiques possèdent des activités intéressantes en matière de prévention des risques de maladies cardiovasculaires. Cependant, les gènes impliqués dans la production des peptides associés sont pour le moment non identifiés chez les bactéries lactiques malgré le séquençage de génomes de souches capables de produire ce type de peptides (Slattery et *al.*, 2010).

* la production des métabolites d'intérêt technologique : EPS, diacétyle.....

- ✓ **L'étude des différentes interactions** constitue un axe de recherche devant être encore développé afin d'initier une démarche qui permettrait d'évoluer vers une autre approche de la sélection de souches à des fins d'utilisation comme culture starter. Une attention particulière sera portée aux filières de produits laitiers, fromages au lait cru...
- ✓ Un autre critère souvent étudié pour la recherche de souches d'intérêt consiste à mesurer **l'effet antagoniste** de souches d'intérêt sur l'inhibition de la croissance de souches pathogènes. Il serait donc important de tester notre collection de bactéries lactiques envers un panel de souches pathogènes. Ainsi, L'identification des substances antimicrobiennes autres que des acides organiques serait intéressante. Un possible effet synergique des différentes substances inhibitrices des germes pathogènes pourrait alors être visualisé en étudiant le potentiel bio-protecteur de cultures mixtes de bactéries lactiques.
- ✓ Concernant l'utilisation des bactéries lactiques en tant que **probiotiques** pour l'alimentation humaine, de nombreuses études seront nécessaires avant une éventuelle demande de reconnaissance par les organismes de contrôle.

Références bibliographiques

- Achemchem, F., Abrini, J. (2005).** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*. Tétouan, Maroc. pp : 170-182.
- Adams, M. R. and Marteau, P. (1995).** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* **27**, 263-264.
- AFSSA. (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.
- Aguirre, M. and Collins, M. D. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* **75**, 95-107.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T. et Teixeira, P. (2007).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from « Alheiras » (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat Science* **76**, (4), 796-800.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. & Klaenhammer, T.R. (2005).** Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 3906- 3912.
- Alves de Oliveira, L. (2007).** Composition chimique du lait, Cours de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Alimentation des Animaux.
- Aslam, S., Qazi, J.I. (2010).** Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *J. Zool Pakistan* **42**(5), 567-573.
- Aslim, B., Beyatli, Y. et Yuksekdog, Z.N. (2006).** Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 973-979.
- Atlan, D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal, R., Yvon, M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.
- Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El Soda, M. (2004).** Selection of Wild Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Egyptian Dairy Products According to Production and Technological Criteria. *Food Microbiology* **21**, 715-725.

Badel, S., Bernardi, T. & Michaud, P. (2011). A New perspective for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **29**, 54-66.

Badis, A. (2004). Identification et caractérisation technologique de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de quatre populations caprines locales. Thèse de doctorat, Université d'Oran.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* **21**(3), 343-349.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru chèvre de deux populations caprines locales ARABIA et KABYLE. *Sci.Technol* **23**, 30-37.

Bahri, F. (2014). Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants. Thèse de doctorat, Université Constantine I, Algérie.

Ballows, A., Truper, H., Dvorkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. (1991). In : the procaryotes. New York : Springer-Verlag, vol. II, pp.1468- 1485-1564.

Barrette, B. (2000). Identification de peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine- I (ACE) dans des laits fermentés par *Lactobacillus helveticus*. Mémoire pour l'obtention du grade de maître en Sciences, Université de Laval, Canada.

Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1729-1738.

Bekhouche, F., Bachir-Cherif. et Gheribi, M. (1998). Isolement et identification de bactéries lactiques à partir de lait cru de vaches. XIème journée nationale de Microbiologie. Oran, Algérie.

Bekhouche, F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état : Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires (INATAA) : Constantine, Algérie, p. 21-22.

Bencharif, A. (2001). Stratégies des acteurs des filières lait en Algérie : état des lieux et problématiques. In : les filières et marchés du lait et denrées en méditerranée. *Options méditerranéennes*, Série B 32/ 25-45.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N. L., Cogan, T. M. (2001). Recent Advances in Cheese Microbiology. *International Dairy Journal* **11**, 259-274.[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).

Bergey's Manual. (2009). Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer.

- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.F, Servin, A. (1993).** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of 118 enteropathogen-cell interactions. *Ap. Env. Microbiol* **59**, 4121-4128.
- Berthier, F., Ehrlich, D.S. (1998).** Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol of Letters***161**, 97-106.
- Bjorkroth, J.A., Holzapfel, W.H ; Dicks, L.M. (2009).** Genus *Leuconostoc*. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition .vol 3 Springer
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. & Sorokin, A. (2001).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**, 731-753.
- Borriello, S.P., Hammes, W.P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., Valtonen, V. (2003).** Safety of Probiotics That Contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin.Inf. Dis* **36**,775–780
- Boumehira, A.Z., Mami, A., Hamedi, A.R., Henni, J.E, Kihal, M. (2011).** Identification and characterization of functional and technological *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Raw Goat and camel milk collected in Algeria. *J.Pure.Appl. Microbiol* **5**(2), 553-556.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Divies, C. et Garmyn, D., (2001).** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *INRA EDP Sciences*, pp : 75-82.
- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E. (2006).** Diversité génomique et temporelle des flores lactobacilles, bactéries propioniques et entérocoques isolées de laits crus. *Colloque SFM*, 7 novembre, Paris.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F. (2005).** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. of Food Microbiology* **104**, 309-324.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brenndand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M.E, Steele, J.L. (2002).** Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced fat cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol* **68**,1778-1785.
- Callaway, T.R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Harvey, R. B., Genovese, K. J. et Kennedy, C.N. (2008).** Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Animal Health Research Reviews* **9**, 217-225.
- Callon, C., Duthoit, F., Delbes, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Cremoux, R., Montel, M.C. (2007).** Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Applied Microbiol* **30**, 547-560

- Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E., Baffone, W. (2012).** Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the Growth and Adhesion/Invasion Characteristics of Human *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol* **64**, 371–378.
- Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A., Sarullo, V. (2003).** Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* **13**, 191-200.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **69**, 330-339.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S., (2002).** Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in northern Thailand. *Research article Sci Asia* **28**, pp. 241-245. Characterization and specificity for β -casein. *Appl Envir Microbiol* **65**, 2035-2040.
- Charteris, W.P, Kelly, P.M, Morelli, L. & Collins, J.K. (1998).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food. Prot* **61**, 1636–1643.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K. (2001).** Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37°C. *J.Basic.Microbiol* **41**, pp. 241-251.
- Cholet, O. (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat : Institut National Agronomique Paris-Grignon: Ecole Doctorale ABIES: UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA. p.16.
- Chopra, A. K., Mathur, D. K. (1983).** Factors affecting protease production by *Bacillus stearo thermophiles* RM-67. *J. Food Protect* **116**, 1020-1025
- Cintas, L.M., Herranz, C., Hernandez, P.E., Casaus, M.P., Nes, I.F. & Hernandez, P.E. (2001).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int* **7**(4), 281-305.
- Coconnier, M.H., Brenet, M., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J. & Servin, A.L. (1993).** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decrease bacterial invasion. *FEMS. Microbiol. Let* **110**, 299-306.
- Cogan, T.M. (1996).** History and Taxonomy of starter cultures. In T.M. Cogan, et J.P. Accolas (Eds), Dairy starter cultures (pp1-20). New York : VCH Publishers Inc.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y., Salminen, S. (2005).** Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion. *J. Food Prot* **68**, 2672-2678.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S., Jones, D. (1987).** Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J.Syst. Bacteriol* **37**, p.310-316.

- Collins, M.D., Phillips, B.A. and Zanoni, P. (1989).** Desoxy ribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp nov, subsp *paracasei* and subsp *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp nov, comb nov. *Int J Syst Bacterio* **39**,105-108.
- Colwell, R. R. (1970).** Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* **104**, 410-433.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, Z. (2005).** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmegiano Reggiona cheese. *Lait* **85**,193–204.
- Corrieu, G., Luquet, F.M. (2008).** Bactéries lactiques : De la génétique aux ferments (Coll, Sciences et techniques agroalimentaires). Paris. France: Lavoisier, Tec & Doc.
- Courtet Leymarios, F. (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour doctorat vétérinaire, Alfort, 128p.
- Dacosta, Y. (2000).** La bioconservation des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques. Paris: Yves Dacosta, p. 196.
- Dagdemir, E., Ozdemir, S. (2008).** Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. *Int. J. Dairy Technol* **61** (2), 133-140.
- Dalmaso, M., Prestoz, S., Rigobello, V., Demarigny, Y. (2008).** Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International* **14**, 469-477
- De Ambrosini, V.M., Gonzalez, S., Perdigon, G., De Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. (1996).** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* **44**(12), 2263-2267
- Deguchi, Y. et Morishita, T. (1992).** Nutritional requirement in multiple auxotrophic lactic acid bacteria: genetic lesion affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici*. *Biosci.Biotechnol.Biochem* **56**, pp.913-918.
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle. Produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Edit. Tec & Doc Lavoisier. Paris.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2010).** Characterization by SPME-GCMS of the Volatile Profile of a Spanish Soft Cheese P.D.O. Tortadel Casar during Ripening. *Food Chemistry* **118**, 182-189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.081>.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. De Roissart, H. et Luquet, F. M., Loriga Uriage, France.
- Delorme, C. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 274–277.

- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A., Duboz, G. (1996).** Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .1. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait* **76**, 371-387.
- Den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., Van Sinderen, D., Kuipers, O.P. and Kok, J. (2005).** Probing direct interactions between CodY and the Opp D promoter of *Lactococcus lactis*. *J.Bacteriol* **187**, 512.
- De Roissart, H., Luquet, F.M. (1994).** « Bactéries Lactiques » Vol I et II. Éd Loriga.
- Desmazeaud, M. (1992).** Les bactéries lactiques. In: les groupes microbiens d'intérêts laitiers CEPIL (Ed), Paris, 9-60.
- Desmazeaud, M. (1998).** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab de recherches laitières. INRA, 1-3.
- De Smet, I., De Boever, P., Verstraete, W. (1998).** Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *British journal of nutrition* **79**, 185-194.
- DeVos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. Whiteman, W. B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.
- DeVos, W.M., Siezen, R.J. (1994).** Engineering pivotal proteins for lactococcal proteolysis. In Biotechnology of milk products. Andrews, A.T., Varley, J(éd). Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.p.56-71.
- De Vuyst, L. et Degeest, B. (1999).** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* **23**, 153-177.
- Dib, H., Hajj Semaan, E., Mrad, R., Ayoub, J., Choueiry, L., Moussa, H., Bitar, G. (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal* **13**(1).
- Dilmi-Bouras, A. (2002).** Survie de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Institut National Agronomique El-Harrach, Alger, Algérie.
- Djellouli, M. (2010).** Caractérisation technologique de souches de lactobacilles isolées de lait camelin. Etude de leur activité protéolytique dans le lait. Mémoire de Magister en Biotechnologie, Université d'Oran, Algérie.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **13**,143-154.
- Drewnowski, A. (2005).** Concept of a nutritious food: Towards a nutrient density score. *Am. J. Clin. Nutr* **82**, 721-732.
- Drici, H., Gilbert, C., Kihal, M. et Atlan, D. (2009).** Citrate fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromadary's milk atypical. *J. Appl.Microbiol* **108**, 647-657.

Drider, D., Prévost, H. (2009). Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles Edition : Economica.

Duboc, Ph. et Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* **11**, 759–768.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* **73**, 386S-392.

Ebel, B. (2012). Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Eddelbarh, A. (1989). Systèmes extensifs d'élevage bovin laitier. Options Méditerranéennes, Série A, *Séminaires Méditerranéennes* n° **6**, 123-133.

EFSA. (2010). EFSA delivers advice on further 808 health claims Ehrlich SD (2009) Probiotics : little evidence for a link to obesity. *Nat Rev Microbiol* **7**, 901; author reply 901.

El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2010). Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dair products for their proteolytic activity. *Food Chemistry* **120**, 758–764, doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.007

Fall, P. A. (2011). Etude des interactions entre la bactérie bioprotectrice *Lactococcus piscium* et *Brochothrix thermophilacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale. Thèse de doctorat en Microbiologie Alimentaire. Ecole doctorale VENAM : Université de Nantes.

FAO. (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° **28**, ISBN 92-5-20534-6.

FAO/OMS. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). *Working Group Report*. Cordoba, Argentina.

FAO/OMS. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in Food.

FAO/WHO. (2006). Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. In: FAO Food and Nutrition Paper 85 Roma.

Feliachi, K. (2003). Rapport national sur les ressources génétiques animales : Algérie. Commission nationale, Point focal Algérien pour les ressources génétiques, 1-46.

- Ferain, T., Schank, A.N., Delcour. (1996).** Nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an IdhL-IdhD double knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J. bacterial* **178**, 7311-7315.
- Fernandez-espla, M.D., Garault, P., Monnet, V. & Rul, F. (2000).** *Streptococcus* wall-anchored proteinase : release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol***66**, (11), 4772-4778.
- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F. Torre, P. (2010).** Biodiversity and dynamics of lactic acid bacteria in PDO Ossau-Iraty cheese made from raw ewe's milk. *Int J Food Microbiol*, soumis.
- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F., Torre, P. (2012).** Biodiversity and Growth Dynamics of Lactic Acid Bacteria in Artisanal PDO Ossau-Iraty Cheeses Made from Raw Ewe's Milk with Different Starters. *Food Microbiology* **29**, 33-42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.011>.
- Fischer, G., Decaris, B., Leblond, P. (1997).** Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *Journal of Bacteriology* **179**, 4553-4558
- Fitzsimmons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. et Beresford, T. (1999).** Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol* **65**, 3418-3426.
- Fontina, M.G., Nicastro, G., Garminati, D., Neviani, E, and Manachini, P.L. (1998).** *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 72-80.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. (2001).** Probiotic activities of *Lactobacillus casei ssp rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol* **152**,167-173.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, Jr. P. (1992).** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol* **42**,166-170.
- Fox, P.F. (1989).** Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci* **72**, 1379-1400.
- Fox, P.F. & Wallace, J.M. (1997).** Formation of flavour compounds. *Appl. Microbiol***45**, 17-85. probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* **222**, 28-31.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Pznanski, A. (2009).** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from cow's milk. *International Dairy Journal* **19**, 3-11.
- François, Z.N.N., Florance, F.A., Paul, M.F., Felicitet, M., EL Soda, M. (2007).** Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starters cultures. *Biotechnol*, vol.**6**, n°1, p. 14-21.

- Fredot, E. (2006).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier **25**, 397p.
- Fuller, R. (1991).** Probiotics in human medicine. *Gut* **32**,439-442.
- Fuller, R. & Gibson, G.R. (1997).** Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* **222**, p.28-31.
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M., Dary, A. (2009).** Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophiles* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal* **19**, 89–95, doi: 10.1016/j.idairyj.2008.08.004
- Garcia, P., Rodriguez, L, A. & Martinez, B. (2010).** Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology* **21**(8), 373-382. ISSN 09242244.
- Gatti, M., Contarini, G. & Neviani, E. (1999).** Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1450–1454.
- German, B. et al. (1999).** The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends in Biotechnology* **17**(12), p.492-499.
- Gevers, D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Theses Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium
- Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.P., Briandet, R. (2009).** Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol* **131**, 2-9.
- Gilarová, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M. and Dobias, J. (1994).** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **24**, 315-319.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonello, C., Gatti, M., Lazzi, C. and Marcazzan, G. (2004).** Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int.J. of Food Microbiology* **91**, 129–139.
- Gobbetti, M., Smacchi, E. et Corstti, A. (1996).** The proteolytic system of *Lactobacillus sanfransisco* CBI : purification and characterization of proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl Environ Microbiol* **62** (9), 3220-3226.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2002).** Latent bioactive peptides in milk proteins. Proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC. Crit.Rev. Food Sci.Nutr* **42**, 223-239.
- Godward, G., K. Sultana, K. Kailasapathy, P. Peiris, R. Arumugaswamy. and N. Reynolds. (2000).** "The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods " *Milchwissenschaft* **55**(8),441-445.

- Goebel, B.M. and Stackbrandt, E. (1994).** Cultural and Phylogenetic Analysis of Mixed Microbial Populations Found in Natural and Commercial Bioleaching Environments. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(5). p. 1614-1621
- Gonzalez, L., Sandoval, H., Sarcristan, N., Castro, J. M., Resno, J.M.F., Tornadijo, M.E. (2007).** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese. *Food Control*.**18**, 176-722.
- Gonzalez, L., Fernández Cuadrillero, A., Castro, J. M., Bernardo, A., Tornadijo, M. E. (2015).** Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from San Simón da Costa Cheese (PDO) in Order to Develop an Autochthonous Starter Culture. *Advances in Microbiology* **5**, 748-759, <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.511079>
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. (2001).** *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. Food. Microbiol* **67**(3), 207-216.
- Gordin, B.R., Gorbach, S.L. (1992).** Probiotics for humans. Probiotics, the scientific basis. Ed, Fuller R. Chapman et Hall, Londres.pp :355-376
- Gray, M. V., Sankoff, D. et R. J. Cedergret. (1984).** On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Ra.*, L2: 5837-5852.
- Guedon, E., Martin, C., Gobert, F.X., Ehrlich, S.D., Renault, P., Delorme, C. (2001a).** Réseau de régulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus lactis*. *Le lait* **91**, 65-74.
- Guedon, E., Renault, P., Ehrlich, S.D., Delorme, C. (2001b).** Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide suply. *J. Bacterial* **183**, 3614-3622.
- Gueimonde, M., Ouwehand, A.C. & Salminen, S. (2004).** Safety of probiotics. *Scand J Nutr* **48**, 42-49.
- Guessass B., Hadadji, M., Saidi, N.et Kihal, M. (2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci* **32**(3), 304-312.
- Guiraud, J.P. et Galzy, P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Eds. Usine nouvelle Paris, 239 p.
- Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod.Paris, 90-292.
- Gusils, C., Chaia A.P., Olivier G. et Gonzalez S. (2010).** Microtechnique for identification of lactic acid bacteria. Methods in molecular biology, Vol. 268: Public Health Microbiology: Methods and Protocols. *Humana Press*. Totowa. 453-458.

- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, W.P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst. Appl. Microbiol* **24**, 218-226.
- Hammes, W.P. and Vogel, R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In the lactic acid bacteria, the Genera of lactic acid bacteria, vol2, pp.19-54. Edited by B.J.B.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. (2003). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In the prokaryotes : An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edited by M. Dworkin. New York. Springer-Verlag. Epub December 15th.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Ennahar, S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol***11**, 63.
- Hassaine, O., Zadi-Karam, H. and Karam, N.E. (2008). Phenotypic identification and Technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw milks in south Algeria. *EMIR. J. Food Agric* **20**(1), 46-59.
- Hassan A. N., Ipsen R., Janzen T. et Qvist K.B. (2003). Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science* **86**, 1632-1638.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., Savoy de Giori, G. (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL1062. *Appl. Environ. Microbiol* **66**, 5316-5321.
- Hillis, D.H. & M. T., Dixon. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quat. Rev. Biol* **66**, 411-453.
- Hols, P., Kleerebezem, M., Schank, A. N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., De Vos, W.M. (1999). Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol* **17**, 588-592.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond- Bourget, N., Decaris, B., Blotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guedon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 435-463
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995). Boplogical preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* **24**, 343-362.
- Holzappel, W.H., Franz, C., Ludwig, W., Dicks, L.M.T. (2009). Genus I. *Bacillus cohn* 1872. Dans: De-Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Berline: Springer, p. 21–128.

- Hughenoltz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., De Vos, W., Hols, P. (2000).** *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol* **66**, 4112-4114.
- Hydrominus, B., Le Marrec, P., Hadj Sassi, A., Deschamps, A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol* **61**, 193-197.
- Idoui, T., Leghouchi E. et Karam N.E. (2007).** Selection of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjuncts. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* **2**, 188-193.
- Idoui, T. et Karam, N.E. (2008).** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites* **59**, 361-367.
- Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. et Karam, N.E. (2009).** Lactic acid bacteria from "Sheep'sDhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceite* **60**(2), 177-183
- Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T., Singh, R. (2010).** *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy journal* **20**, 133-141
- Jamet, E. (2009).** Les bactéries lactiques: une composante de l'écosystème microbien des fromages. Dans Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 319-348.
- Kacem, M., Zadi-Karam, H. & Karam, N. E. (2003).** *Lactic acid Bacteria* of western Algeria. 1: Characteristics of strains isolated from raw milk and olive oil. *Sciences et Technologies C. (Université Mentouri. Constantine. Algeria)* **20**, pp: 45-50.
- Karam, N. E. (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique: Etude Biochimique et Moléculaire. Thèse de Doctorat d'état, Université d'Oran. Algérie., P.212
- Kawai, Y., Tadokoro, K., Konomi, R., Itoh, K., Saito, T., Kitazawa, H. and Itoh, T. (1999).** A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Dairy .Sci* **82**, 481-485.
- Khalil, R., Mahrous, H., El-Halafawy, K., Kamaly, K., Frank, J., El Soda, M. (2007).** Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *Afr. J. Biotechnol* **6**(7), 939-949.
- Kholif, A.M., Mahran, G. A., El-Nawawy, M. A., Ismail, A. A., Salem, M. M. E. and Zaky, W. M. (2011).** Evaluation of Proteolytic Activity of Some Dairy Lactobacilli. *World. J of Dairy and Food Sciences* **6**(1), 21-26.
- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., kyriacou, A. (2011).** Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe* **17**(6), 440- 443.

Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 393-409.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W., Stiekema, W., Lankhorst, R. M., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M. and Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1990-1995.

Kok, J., De Vos, W.M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. In Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Gasson, M., De Vos, W (éd). Blackie and Professional, London, England.p. 169-210.

Koll, P., Mandar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M. & Hammarstrom, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 139-147.

Köning, H. et Fröhlich, J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.

Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides. Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* **9**, 1297-1308.

Kravstov, E.G., Yarmolayev, A.V., Anokhina, I.V., Yashina, N.V., Chesnokova, V.L. & Dalin, M.V. (2008). Adhesion characteristics of *Lactobacillus* is a criterion of the probiotic choice. *Bull.Exp. Biol. Med* **145**, 232-234.

Krieg, N.R. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Vol: 1.

Kunji, E.R.S, Mierau, I., Hgting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996).The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 187-221.

Kunji, E.R.S, Fang, G, Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., Poolman, B., Konings W.N. (1998). Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*.*Mol. Microbiol* **27**, 1107-1118.

Laan, H., Konings, W.N. (1989). The mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol* **55**, 3103-3106.

Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **144**, 237-250.

Lahtinene, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Wright, A.V. (2012). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Fourth edition, Taylor and Francis Group. Boca Raton London New York.

Lamarque, M., Charbonnel, P., Aubel, D., Piard, J.C., Atlan, D., Juillard, V. (2004). A Multifunction ABC Transporter (Opt) Contributes to Diversity of peptide Uptake Specificity within the genus *Lactococcus*. *J. Bacteriol* **186**, 6492-6500.

- Lapointe, G. (2009).** Métabolisme des bactéries lactiques: la production d'exopolysaccharides. Dans *Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris, France: Drider, D. and Prévost, H., p. 73-98.
- Larpent, J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris, 10-72.
- Latreche, B. (2016).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du beurre cru, évaluation de leurs aptitudes technologiques et leur utilisation dans la fabrication de la crème sure. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Université de Constantine, Algérie.
- Law, J., Haandrikman, A. (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J* **7**, 1-11.
- Lee, J.Y., Kim, C.J. et Kunz, B. (2006).** Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci* **72**, 437-445.
- Leveau, J.Y., Bouix M. et De Roissart, H.B. (1991).** La flore lactique: techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 2 40.
- Leveau, J.Y. et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.
- Lim, E.M., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2000).** Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* **21**, 2557-2561.
- Lister, J. (1873).** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quarterly Microbiological Sciences* **13**, 380-408.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., Devries, E., Abee, T., Hugenholtz, J. (2001).** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* **64**, p.71-80.
- Lorca, G.L., Font de Valdez, G., Ljungh, A. (2002).** Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 525-532.
- Luquet, F.M. (1986).** Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343- 442.
- Macouzet, M. et Champagne, C. P. (2007).** Les bactéries probiotiques : innovations et tendances de développement technologique. *Bioveille*, pp, 4-16.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T., Rodriguez, A, and Suarez, J. E. (2003).** Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. of Food Microbiology* **86**, 213-222.
- Madigan, M., Martinko J. (2007).** Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. Pearson éd., France. pp. 1-1047.

Makarova, K., Lesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15611-15616.

Makarova, K.S. & Koonin, E.V. (2007). Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol* **189**, 1199-1208.

Makela, P., Schillinger, U., Korkeala, H., Holzappel, W.H. (1992). Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homolgy, and identification of *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *Int J Food Microbiol* **16**(2), 167-172.

Mami, A. (2012). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis- à-vis des germes impliquées dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat d'état, Université d'Oran. Algérie., P.176.

Mannu, L., Paba, A., Pes, M, and Scintu, M. F. (2000). Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditionnal Pecorino Sardo cheese. *J. appl. Microbiol* **89**, 191-197.

Marteau, P. and F, Shanahan. (2003). "Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**(5), 725-740.

Mathara, J.M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Shin, H.K. & Holzappel, W.H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus spp.* from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol* **126**, 57-64.

Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int. J. Food. Microbiol* **105**, 281-295.

McLeod, A., Nyquist, O.L., Snipen, L., Naterstad, K. and Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol* **31**(3), 393-403.

Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* **21**, 55-61.

Menad, N., Cheriguene, A., Belarbi, F., Hammouni, R., Moghtet, S. (2014). The Antibacterian Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* against *Salmonella sp.* *J Med Microb Diagn* **3**, 129. doi:10.4172/2161-0703.1000129.

Messaoui, H. (2013). Protéolyse et autolyse de souches de lactobacilles d'origine laitière. Etude de leur aptitude à hydrolyser les caséines et les protéines de poisson. Mémoire de Magister en Biotechnologie, Université d'Oran, Algérie.

- Metlef, S., Dilmi Bouras, A. (2009).** Effect antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature et Technology* **1**,33-44.
- Mezaini, A., Chihib, N.E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N. et Pierre Hornez, J., (2009).** Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of Environmental and Public Health*, Volume 2009, Article ID 678495, 6 pages doi:10.1155/2009/678495.
- Mezaini, A., Dilmi Bouras A. (2013).** Antibacterial activity and probiotic properties of some lactic acid bacteria isolated from dairy products. *African Journal of Biotechnology* **12**, (20), 2949-2956. DOI: 10.5897/AJB09.185.
- Michaelidou, A. and Steijns, J. (2006).** Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. *Int. Dairy J* **16**, 1421–1426.
- Mierau, I., Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Hellendoorn, M.A., Haandrikman, A.J., Poolman, B., Konings, W.N., Venema, G. and Kok, J. (1996).** Multiple –peptidase mutans of *Lactococcus* ability to grow in milk. *J Bacteriol* **178**, 2794-2803.
- Milette, M. (2007).** Etude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites. Thèse de ph D en Biologie, INRS-Institut Armand-Frappier, 274p.
- Miller, G. D., Jarvis, J. K. and McBean, L. D. (2007).** Contribution of dairy foods to health throughout the life cycle. In *Handbook of dairy foods and nutrition* (3rd ed.): 339–399. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Moeller, V. (1955).** Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand* **36**, 158-172.
- Monnet, V., Latrille, E., Beal, C. & Corrieu, G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- Morais, J. (2004).** Estudio de adecuacion de cepas lacticas autoctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboracion de queso. Thèse doctorale. UAB.
- Mozzi, F., Torino, M.I. et Valdez G.F., (2001).** Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. **14**: *Food Microbiol. Protocols. Humana Press*. Totowa. 183-190.
- Nedjraoui, D. (2003).** Algérie, profil fourrager. Document FAO(2003).30pp
- Novel, G. (1993).** Les bactéries lactiques in "Microbiologie industrielle" Les microorganismes d'intérêt industriel, Paris : Techniques et Documentation, Lavoisier, p. 171-215.
- Orla-Jensen, S., (1919).** The lactic acid bacteria. Copenhagen. I Komision Hos Ejnar Munksgaard.

- O'Sullivan, L., Ross, R.P. et Hill, C. (2002).** Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality. *Biochimie* **84**, 593-604.
- Pace, N. R. et A. B. Burgin. (1990).** Processing and evolution of the rRNAs, Hill. W. E., Dalberg, A., Garret, R-A., Moore, P. B., Schlessinger, D. et J. R. Warner. (eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp: 417-425.
- Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K. and Fung, D.Y.C. (2001).** Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 45-49.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. (2006).** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol* **100**,1364-5072.
- Patricia, R.M., Tuinier, R., Kanning, M. et Zoon, P. (2002).** Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis subsp.cremoris* on the viscosity of fermented milk. *International Dairy Journal* **12**, 689- 695.
- Patrignani, F., Lanciotti, R., Mathara, J.M., Guerzoni, M.E. & Holzapfel, W.H. (2006).** Potential of functional strains, isolated from Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int. J. food Microbiol* **107**, 1-11.
- Petransxiene, P. et Lapied, L. (1981).** Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers : Analyses et tests. 2^{ème} édition, Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, pp: 44-81.
- Petry, S., Furlana, S., Waghornec, E., Sanlinder, L., Cerning, J. et Maguin, E. (2003).** Comparaison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, *FEMS Microbiology Letter* **221**, 285-291.
- Pilet, M.F., Magras, C., Federighi, M. (2005).** Bactéries lactiques. In: bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. et Donalds, A. (2003).** Microbiologie. 2^{ème} Edition française de Boeck Université.128 :28-29.
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F & Schell, M.A. (2004).** The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2512-2517.
- Pringsulaka, O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from the fermented meat and fish products. *Food Control* **23**,547-551.
- Pritchard, G., Coolbear, T. (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* **12**, 179-206

- Rasolofa, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D. (2010).** Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* **138**, 108-118.
- Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010).** Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar *typhi* *in vitro* and on ready-to-eat food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**(3), p.520-524.
- Richard, J. (1983).** Composition of dominant and subdominant flora of milk of poor bacteriological quality. *Lait* **63**, 148-170.
- Rishi, P., Preet, S., Kaur, P. (2011).** Effect of *Lb. plantarum* cell-free extract and co119 trimoxazole against *Salmonella typhimurium*: a possible adjunct therapy. *Ann. Clin. Microbiol.* Antimicrob.10:9. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/10/1/9>.
- Rodriguez, J., Requena, T, Gouedranche, H., Maubois, J.L., Juarez, M. (1996).** Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltrated milk by using a Lac-Prt- strain of *Lactococci*. *Lait* **76**, 513-522.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2001).** The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev* **25**, 39-67.
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N.E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res* **34** (2), 218-227.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2001).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 163-171.
- Ruiz Moyano, S., Martin, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., Cordoba, M.G. (2008).** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science., In Press*, Corrected proof.
- Sadi, (2006).** Effet de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* extermophiles sur le taux de cholestérol. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Université de Chlef, Algérie.
- Saidi, N. (1998).** Bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse de Magister. Université d'Oran.
- Saitou, N., Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, P., De los Sava, N., Plancken, I.V.D., Claeys, W. and Hendriekx, M. (2008).** The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* **88**, 1646-1653.

Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food. Microbiol.* **44**(1-2), 93-106.

Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics genes. *Trends. Microbiol* **12**, 412-416.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry Salami. *Int. J. Food Microbiol* **23**, 179-196.

Saraela, M., Morgensen, G, Fonden, R., Matto, J. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* **84**, p, 197-215

Savijokie, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **71**, 394-406.

Sawaya, W.N., Safi, W.J. & Shalhat, A.F. (1984). Chemical composition and nutritive value of goats milk. *J.Dairy.Sci* **67**, pp. 1655-1659.

Schaafsma, G. and Steijns, J. M. (2000). Dairy ingredients as a source of functional foods. In Schmittle, M.K. and Labuza, T.P. (Eds.), *Essentials of functional foods* (pp. 181–204). Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers Inc.

Schillinger, U., Lucke, F. K. (1987). Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. *J. Food. Microbiol* **4**, 199-208.

Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D., Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen, nov. *Appl. Microbiol* **6**, 183-195.

Servin, A.L. (2004). Antagonistic activity of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev* **28**, 405-440.

Settanni, L. and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **121**, 123-138.

Shirai, K., Guerrero, I., Huertas, S., Saucedo, G., Castillo, A.O., Gonzalez, R., George, M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation Hall Enzyme and Microbial Technology, p. 446-452.

Siezen, R.J. (1999). Multi-domain, cell- envelopp proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 139-155

- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G.F, Beresford, T. & Ross, R.P. (2010).** Invited review: *Lactobacillus helveticus*: A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science* **93**, 4435-4454.
- Smid, E.J., Starrenburg, M.J.C., Mierau I., Sybesma, W. & Hugenholtz, J. (2001).** Increase of folate levels in fermented foods. *Innovations Food Technol.* Feb/Mar, pp. 13-15.
- Sousa, M.J., Ardo, Y., McSweeney, P.L.H. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy. J* **11**, 327-345.
- Steijns, J.M. (2001a).** Milk ingredients as nutraceuticals. *Int. J. Dairy Technol* **54**, 81–88.
- Steijns, J.M. (2001b).** Proteins, peptides and amino acids. In J. Young (Ed.), *Guide to functional food ingredients* (pp. 235–275). Surrey, UK: Leather head Food RA Publishing.
- Steijns, J.N. (2008).** Dairy products and health : Focus on their constituents or on the matrix ? *Int.Dairy J* **18**, 425-435.
- Steijns, J.M. and van Hooydonk, A. C. M. (2000).** Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British J. Nutr* **84** (Suppl. 1), S11–S17
- Stiles, M.E. (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 331-345.
- Stiles, M.E., Holzappel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 1-29.
- Tabak, S. (2007).** Interactions entre *Helicobacter pylori* responsable de maladies gastroduodénales et Bifidobacteries. Mémoire de magister, Université d’Oran, Algérie.
- Tadesse, G., Ephraim, E., Ashenafi, M. (2004).** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *International Journal of Food Safety* **5**, 13-20.
- Tamime, A.Y. (1990).** Microbiology of starter cultures. In : Robinson, R.K. (Ed), *Dairy Microbiology*, vol. 2. Elsevier, London.pp.131-201.
- Tamime, A.Y. (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology hand book (RobinsonR.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.
- Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K. and Alatossava, T. (1999).** Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4264-4267
- Tejero-Sarinena, S., Barlow, S.J., Costabile, A., Gibson, G.R., Rowland, I. (2012).** *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* **18**(5), 530-538.

Temmerman, R., Huys, G. et Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria : culture- dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci Tech* **15**, 348-359.

Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2006). Phenotypic indentification and technological properties of lactic aid bacteria isolated from traditionally fish products of the eastern himalayas. *International J Food Microbiol*, vol. **107**, n°1, p. 8-33.

Thompson, J., Genry-Weeks, C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : De Roissardet Luquet, Bactéries lactiques, Paris : Tec & Doc., Lavoisier.

Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Ali Haimoud Lekhal, D., Roques, C. (2010). Relation ship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles". *International Journal of Dairy Science*, In Press.

Toualbia, M., Dilmi Bouras, A., Koiche., M., Kerkoud., M, Nemar, F., Sadoud, M. (2016). *Lactobacillus plantarum*, a camel milk bacterium, isolated identified and characterized for its antagonist activity against diarrheal bacteria. *Der Pharmacia Letter* **8**(8), 313-318.

Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., VanBeeumen, J. and Kalantzopoulos, G. (1999). Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC178: Characterization and specificity for b-casein. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(5), 2035-2040

Tsenkovskii, L. (1878). Gel formation in sugar beet solutions. *Proc. Soc. Sci. Nat. Imper. Univ. Karkov* **12**, p.137-167.

Turpin, W., Humblot, C., Thomas. M & Guyot, J.P. (2010). Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol* **143**, 87-102.

Turpin, W. (2011). Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire. Thèse de doctorat, Université Montpellier 2 Sciences et Techniques du LangueDoc, 169p.

Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., Haandrikman, A. (1993). Genetic and Biochemical characeization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol* **175**, 7523- 7532.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**, 407-438.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D. & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 187-216.

Vaughan, E.E., Mollet, B., Devos, W.M. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Cur. Opin. Biotechnol* **10**, 505-510.

- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Farnworth, E. & Matar, C. (2007).** Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* **36**, 254-260.
- Von Wright, A., Axelsson, L. (2012).** Lactic Acid Bacteria: An Introduction. Dans : Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., Von Wright A. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. 4^{ème} Ed. Taylor & Francis Group, p. 2-14.
- Vuillemard, J.C. (1986).** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Technique & Documentaion, Lavoisier. Paris, **3**, 1-65.
- Walling, E.G., Indreau E. et Lonvaud-Funel, A. (2001).** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point d'outils moléculaires de détection. *INRA*. 289-300.
- Wang, S.L., Wang, C.W., Huang, T.Y. (2007).** Microbial reclamation of squidpen for the production of a novel extracellular serine protease by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* TKU012. *Bioresour. Technol.* doi : 10.1016.et al., 2007.
- Welman, A.D. et Maddox, I.S. (2003).** Exoplysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* **21**, 269-274.
- WHO/FAO. (2001).** Human vitamin and mineral requirements, Food and Agriculture Organization. Rome, 286pp.
- Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J., Stahl, D.A. (1985).** Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**, 83-86.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4576-4579.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. and Smit, G. (2002).** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* **12**, 91-109.
- Wu, M.H., Pan, T.M., Wu, Y.J., Chang, S.J., Chang, M.S. et Hu, C.Y. (2010).** Exopolysaccharide activities from probiotic *Bifidobacterium*: Immunomodulatory effects (on J774A. macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 1-7.
- Xiaodong, P., Fenqin, C., Tianxing, W., Honggang, T., Zhanyu. (2009).** The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food. Control* **20**, 598-602.
- Yakhlef, H. (1989).** Analyse comparée de l'effet des politiques laitiers sur les structures de production et de collecte dans les pays du Maghreb. In : le lait dans la région méditerranéenne. Options Méditerranéennes, Série A, *Séminaires méditerranéens*, n°6, 247-258.
- Yoon, J.I., Bajpai, V.K. & Kang, S.C. (2011).** Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk

samples. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* **49**(1), p.109-114.

Yuksekdag, Z.N. et Beyatli Y. (2003). Kefir Mikroflorasi ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* **1**,49-69.

Yvon, M. (2006). Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* **61**, 80–96.

Zadi-Karam, H. (1998). Bactéries lactiques isolées de *Camelus dromadarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de doctorat, Université de Constantine, Algérie.

Zadi-Karam, H, et Karam, N.E. (2006). Bactéries lactiques de lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura* **24**(3), 153-156.

Zakhia, F. et de Lajudie, P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Rev. Microbiol* **52**,169-181.

Zambunelli, C., Chiavari, C. et al., (2002). Effect of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented food. *Food Technol Biotechnology* **40**, 347-351.

Zhang, H. et Cai, Y. (2014). Lactic acid bacteria fundamentals and practice. *Springer Dordrecht Heidelberg*.

Zourari, A., Accolas, J. P. et Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. *Lait* **72**, 1–34.