

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et
Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie
Moléculaire et Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme
Master en biologie
Option : Microbiologie Appliquée

جامعة محمد السادس بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : A860

Intitulé

***La microflore lactique du rumen : Screening
des souches potentiellement probiotiques***

Membres de jury:

Président: Dr. SIFOUR Mohammed

Examinatrice: Dr. LAAGOUNE Souheila

Encadreur: Mr. KHENNOUF Tarek

Présenté par:

M^{elle}: DROUCHE Wahiba

M^{elle}: BOUHALLAS Chafia

Année universitaire: 2011-2012

Remerciements

Je tiens à d'abord et avant tout à rendre hommage à Allah, m'a donné la patience et le courage pour achever ce travail.

*Je tiens à remercier monsieur **KHENNOUF Tarek**, mon encadreur, pour son aide et son soutien dans tous les moments difficiles de ce travail. Merci de m'avoir accueillie aussi chaleureusement au sein du laboratoire.*

*Je remercie particulièrement le Dr. **SIFOUR Mohamed** qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.*

*Je remercie également **M^{me} LAGGOUNE Souheila** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Je tiens à remercier:

Dr. Idoui Tayeb, M^{me} Bousdira Fathia, M^{me} Ouled-HaddarH., Dr. SIFOUR Mohamed de vos enseignements

Je passe un grand merci:

A ma mère : parce que tu es un soleil dans ma vie, que dieu vous garde

Mes frères et mes sœurs: parce que vous avez toujours été là pour moi, pour m'avoir toujours soutenu, pour votre confiance et votre amour sans faille je vous dit merci

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

A mes amies : Soumaya M., Salima B., Salima A., Salima M, Houda Y. Chafia B,...

A Wahiba : pour cette très belle année passée avec vous.

BOUHALLAS Chafia

Remerciement

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

J'exprime mes remerciements les plus profonds pour tous les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail ;

Mr KHENNOUF Tarek pour m'avoir encadré et codirigé ce travail. J'ai été particulièrement touchée par sa rigueur scientifique et l'attention qu'il m'a accordée malgré ses obligations, à sa gentillesse.

Mr SIFOUR Mohamed qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

M^{lle} LAGGOUNE Souheila d'avoir accepté d'examiner mon travail, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Mr IDOUI Tayeb pour ses précieux conseils et suggestions ; Mr TILBI Abdenasser et Mr SIFOUR Mohamed pour m'avoir donné l'occasion de m'inscrire au sein de la Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et la Vie pour continuer mes études en Master 2 à l'université de Jijel et les enseignants qui m'acceptes chez vous : M^{me} Bousdira F., M^{me} Roula S., M^{lle} Boussouf L., M^{me} Ouled-Haddar H. et d'autres.

Mr ARRAS Elkhaier directeur de l'école primaire ARRAS Mostapha pour leur plaisir de me donner la chance pour continuer mes études après 07 ans de séparation d'école.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à ma mère pour leur soutien moral et matériel tout au long de mes études, Mon fiancé Manour Mahmoud, mes sœurs et mes amies.

A toutes les personnes morales et physiques qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Enfin, je dédie ce travail à la mémoire de mon père. Que DIEU vous accueille dans son PARADIS.

DROUCHE Wahiba

Sommaire

Introduction générale	01
-----------------------	----

I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1: Les bactéries lactiques.

1.	Historique	02
2.	Définition	02
3.	Caractéristiques générales des bactéries lactiques	02
4.	Habitat	04
5.	Classification	04
6.	Les différents genres des bactéries lactiques	06
6.1.	Le genre <i>Lactobacillus</i>	06
6.2.	Les Streptocoques lactiques : le genre <i>Streptococcus</i>	08
6.3.	Le genre <i>Lactococcus</i>	08
6.4.	Le genre <i>Leuconostoc</i>	08
6.5.	Le genre <i>Pediococcus</i>	09
6.6.	Le genre <i>Carnobacterium</i>	09
6.7.	Le genre <i>Bifidobacterium</i>	09
6.8.	Le genre <i>Propionobacterium</i>	10
7.	Méthodes d'identification des bactéries lactiques	10
7.1.	Les méthodes classiques	10
7.2.	Les méthodes moléculaires	10
8.	Les propriétés technologiques des bactéries lactiques	11
8.1.	L'aptitude acidifiant	11
8.2.	Activité protéolytique	11
8.3.	Activité lipolytique	11
8.4.	Activité aromatisante	12
8.5.	Propriété texturant	12
8.6.	Production des substances inhibitrices	12
9.	Utilisations des bactéries lactiques	12
9.1.	Domaine alimentaire	12
9.1.1.	Rôle sur la structure et la texture	12
9.1.2.	Rôles dans la conservation	12
9.1.3.	Rôles sur les caractéristiques organoleptiques	13
9.2.	Domaine sanitaire ou l'effet probiotique des bactéries lactiques	13

Chapitre 2 : Les probiotique

1.	Historique de la définition des probiotiques	14
2.	Les différents groupes de probiotiques	14
2.1.	Les ferments lactiques	14
2.2.	Les bifidobactéries	14
2.3.	Les différentes levures de type <i>Saccharomyces</i>	15
2.4.	Les autres bactéries sporulées	15
3.	Critères de sélection	15
4.	Mécanisme d'action des probiotiques	15

5.	Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé	16
5.1.	Amélioration de la digestion du lactose	16
5.2.	Diminution des allergies alimentaires	16
5.3.	Réduction du risque des diarrhées	16
5.4.	Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	16
5.5.	Réduction du cholestérol	16
5.6.	Prévention du cancer du côlon	16
6.	Les facteurs qui influencent l'effet probiotique des bactéries lactiques	16
6.1.	Genres ou les souches probiotiques	16
6.2.	Mode d'administration	16
6.3.	Catégories de population	17

Chapitre 3 : Le rumen

1.	Introduction	18
2.	Caractéristiques physico-chimiques du rumen	18
3.	Description de la microflore ruminale	18
3.1.	Les bactéries	19
3.1.1.	Les bactéries cellulolytiques	19
3.1.2.	Les bactéries pectinolytiques	19
3.1.3.	Les bactéries amylolytiques	20
3.1.4.	Les bactéries utilisatrices de glucides simples	20
3.1.5.	Les bactéries protéolytiques	20
3.1.6.	Les bactéries lipolytiques	20
3.1.7.	Les bactéries uréolytiques	20
3.1.8.	Les bactéries de grande taille	20
3.2.	Les Archaea (bactéries méthanogènes)	20
3.3.	Les protozoaires	21
3.4.	Les champignons	21
3.5.	Les bactériophages	21
4.	Les principales voies fermentaires ruminales et leurs métabolites	21
4.1.	La fermentation lactique	22
4.2.	La fermentation propionique	22
4.3.	La méthanogénèse	22
5.	Utilisation des probiotiques chez le ruminant	22
6.	Les interactions microbiennes dans le rumen	23

II. Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

1.	Matériel	24
1.1.	Le rumen	24
1.2.	Les souches bactériennes indicatrices	24
1.3.	Disques d'antibiotiques	24
1.4.	Milieux de culture	24
1.5.	Les sucres	25
1.6.	Autres produits chimiques et réactifs	25
1.7.	Appareillage et autres	25

2.	Méthodes	25
2.1.	Evaluation de la microflore lactique du rumen	25
2.2.	Mise en place des souches de bactéries lactiques du rumen	26
2.3.	Aptitudes technologiques des bactéries lactiques	28
2.3.1.	Pouvoir acidifiant	28
2.3.2.	Pouvoir protéolytique des bactéries lactiques isolées	29
2.3.3.	Pouvoir texturant des bactéries lactiques isolées	29
2.4.	Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées	29
2.4.1.	Tolérance aux acides	29
2.4.2.	Pouvoir antagoniste des souches	30
2.4.3.	La Résistance s aux antibiotiques	30

Résultats et discussions

1.	Isolement, purification et identification des bactéries lactiques	31
1.1.	Examen macroscopique	31
1.2.	Examen microscopiques	31
1.3.	Tests biochimiques	31
1.4.	Profil de fermentation des sucres	33
1.5.	Identification des souches	33
2.	Etude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques	35
2.1.	Pouvoir acidifiant	35
2.2.	Activité protéolytique	41
2.3.	Pouvoir texturant	41
2.4.	Tolérance aux acides	43
2.5.	Pouvoir antagoniste des souches	45
2.6.	Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques	46
	Conclusion	48
	Références bibliographiques	49
	Annexe	

Liste des figures

Figure 01: Dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	03
Figure 02: Arbre phylogénétique basée sur l'analyse comparative du gène ARN-16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage GC dans l'ADN et les bactéries Gram + du genre <i>Bifidobacterium</i> et la <i>Propionobacterium</i>	05
Figure 03: Les différentes parties du rumen.....	18
Figure 04: Résultats du test de l'ADH.....	32
Figure 05: Le type fermentaire sur milieu Gibson et Abd-elmalek.....	33
Figure 06: les différents cas résultats des fermentations des sucres.....	34
Figure 07: Répartition des espèces des bactéries lactiques en pourcentage	35
Figure 08 (a) : La quantité d'acides lactique à 0 heures.....	37
Figure 08 (b) : Le pH du de lait à $t_0=0$ heures.....	37
Figure 09 (a) : La quantité d'acide lactique après 3h d'incubation.....	38
Figure 09 (b) : Le pH de lait après 3h d'incubation.....	38
Figure 010 (a) : La quantité d'acide lactique après 6h d'incubation	39
Figure 010 (b) : Le pH de lait apres 6h d'incubation	39
Figure 011 (a) : La quantité d'acide lactique après 24h d'incubation	40
Figure 011 (b): le pH de lait après 24h d'incubation.....	40
Figure 12: La production des polysaccharides par les bactéries lactiques sur milieu hypersaccharosée.....	42
Figure 13: la survie (%) des souches à pH 2 après 6h et 24h.....	45
Figure 14: la survie (%) des souches à pH 4 après 6h et 24h.....	45

Liste des tableaux

Tableau 01: Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques...	06
Tableau 02: Les différents genres des bactéries lactiques et leur principales caractéristiques...	07
Tableau 03 : Critères différentiels des trois groupes de <i>Lactobacillus</i>	07
Tableau 04: Les deux groupes des espèces <i>Propionibacterium</i>	10
Tableau 05: Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques.....	15
Tableau 06: Exemple d'interactions microbiennes au sein de l'écosystème ruminal.....	23
Tableau 07: Profils biochimique des souches de bactéries lactiques.....	32
Tableau 08: Profil de fermentation des sucres par les souches isolées.....	33
Tableau 09: Les noms scientifiques des espèces identifiées.....	35
Tableau 10: Résultats de l'activité acidifiante des souches identifiées et ceux du pH.....	36
Tableau 11: Production des polysaccharides par les bactéries lactiques.....	42
Tableau 12 : Les résultats de la DO obtenus, relatifs à la croissance des souches lactiques sur les milieux à pH2, pH 4, comparé à une croissance sur le milieu ordinaire à pH 6.5.....	43
Tableau 13 : Représente le pourcentage de la survie des bactéries lactiques isolées sur milieu à pH 2 et à pH 4.	44
Tableau 14: Résultats de l'antibiogramme.....	46

1. Synthèse bibliographique

Liste des abréviations

- A°D** : Acidité dornique
- ATCC** : American type culture collection
- ADH** : Enzyme de l'arginine dihydrolase
- DO** : Densité optique
- EPS** : exopolysaccharides
- PTG** : PepTidoGlycane
- MRS** : Man-Rogosa-Sharp
- FAO** : Food and Agriculture Organisation
- YMA** : Yeats Milk Agar
- OMS** : Organisation mondiale de la santé
- ssp:** Subspecies
- pH:** potentiel d'Hydrogène
- ATB:** Antibiotiques
- LAB:** Lactic Acid Bacteria

Introduction

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme, représentées par : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations des produits alimentaires comme starter permettant de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation, comme culture protectrice dans des produits non fermentés grâce à leur pouvoir antagoniste par la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyle et les bactériocines.

Ainsi, elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées des produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS « Generally Recognized As Safe » (Dortu et Thonart, 2009)

En effet, de plus en plus, les bactéries lactiques sont recherchées pour d'autres performances probiotiques telles que la tolérance aux conditions hostile du tractus gastro-intestinale (l'acidité, la bile), ainsi que la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales et la résistance aux antibiotiques (Corrieu et Luquet, 2005).

Parmi les niches écologiques où on peut trouver les bactéries lactiques, on a le rumen qui est un biotope ou fermenteur ouvert dont leurs caractéristiques sont favorables au développement d'une micropopulation anaérobie et diversifiée.

Toutes les données bibliographiques nous était très intéressantes, ainsi nous avons opté à mener un travail qui aura le but de mettre en évidence les propriétés technologiques et probiotiques des bactéries lactiques à partir du rumen de la chèvre.

Ce travail a été accompli en deux parties, une synthèse bibliographique qui a permis en premier temps d'élargir nos connaissances sur les bactéries lactiques et les probiotiques chez les ruminants.

Une deuxième partie portant sur l'étude expérimentale dont laquelle nous avons établi des profils d'identification des bactéries lactiques du rumen de la chèvre, ensuite on est passé à l'étude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques.

Chapitre I : Les bactéries lactiques

1. Historique

Les bactéries ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (**Saloffe, 1994**). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certains chercheurs ont pu isoler un streptocoque (**Poullain, 1994**).

1. Définition

Le groupe des bactéries lactiques, a été défini pour la 1ère fois par **Orla-jensen (1919)**, réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**). Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes (**De Roissart, 1986**) (**figure1**).

2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

- ❖ Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négatives, nitrate réductase négative, anaérobies ou aéro-tolérantes (**Laurent et al., 1998**).
- ❖ Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets (**Bourgeois et Larpent, 1996**).
- ❖ Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets (**Bekhouche, 2006**). Elles présentent d'autres caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement : Ce sont des bactéries Gram positive généralement immobiles, jamais sporulées, catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate-réductases négatives (**Tredez, 2008**).
- ❖ Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles (**Novel, 1993**).
- ❖ Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté) (**Bekhouche, 2006**).
- ❖ Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté) (**Bekhouche, 2006**).
- ❖ Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de faire la fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre utilisé (**Tredez, 2008**).
- ❖ Ce sont aéro-anaérobies facultatives ou microaérophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de faire la phosphorylation oxydative car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème (**Bekhouche, 2006**).

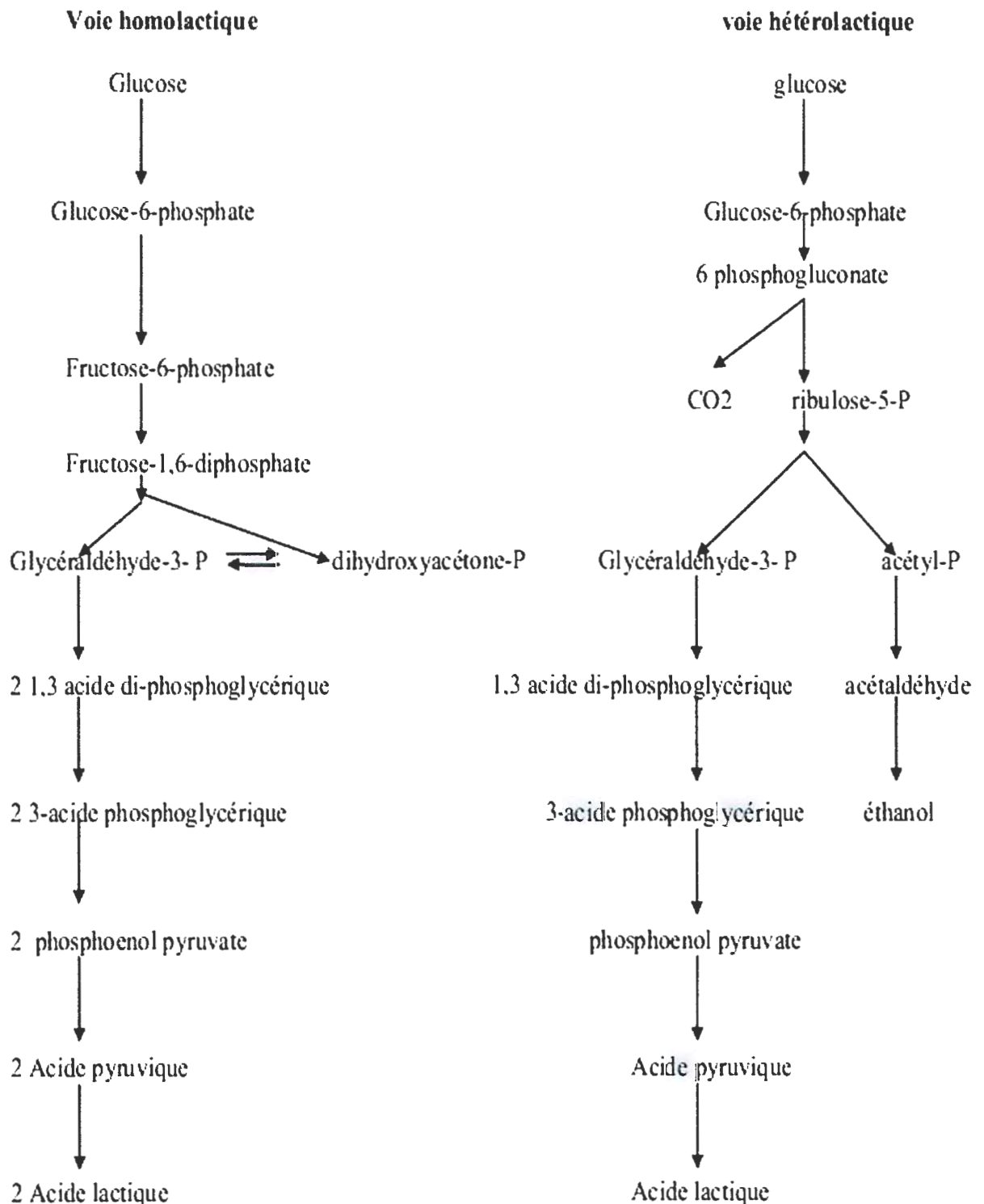


Figure 01: Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994).

- ❖ Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH= 4,0 à 4,5 et certaines sont encore active à pH= 9,6 ou pH=3,2. elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel. Enfin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytique et lipolytique (Baliarda, 2003).
- ❖ Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques (bases puriques et pyrimidiques), des vitamines et

des acides gras. Cela explique aussi leur métabolisme fermentaire : incapables de synthétiser le noyau hème des porphyrines (Tredez, 2008). C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait.

- ❖ Elles fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments (Bekhouche, 2006).
- ❖ Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et, si les conditions de développement sont favorables, de l'élaboration de bactériocines comme la nisine (Labioui et al, 2005).

3. Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux : des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait) (Bekhouche, 2006). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu et Thonart, 2009). Et elles ont également été retrouvées dans le sol, l'eau, les engrais et les eaux d'égout (Givry, 2006).

4. Classification

Le terme LAB est intimement associé aux bactéries impliquées dans la nourriture et la fermentation alimentaire, historiquement les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* forment le cœur du groupe (Ouweland, 2004). Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance différente. Les quatre genres traditionnels de bactéries lactiques sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (maintenant subdivisé en *Streptococcus* et *Lactococcus*), auxquels a été rajouté le genre *Bifidobacterium*, anciennement classé dans les *Lactobacillus*, mais cependant assez éloigné génétiquement de ces derniers (Tredez, 2008). Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière (Givry, 2006). La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variantes au sein d'une même espèce. Ces tests sont :

- ❖ Le type de Gram, la morphologie et la disposition cellulaire ;
- ❖ Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques et le caractère fermentaire ;
- ❖ La croissance des cellules sur des milieux hostiles ;
- ❖ Et la synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages ;

Puis, des études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces selon les critères suivants :

- ❖ La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'observer le type d'espèce selon la nature de la liaison peptidique ;
- ❖ Et la composition de l'ADN mesurée par hybridation permet de différencier les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage en bases Guanine + Cytosine (G-C %) permet le rapprochement des genres *Streptococcus* (34-46%), *Leuconostoc* (36-43 %) et *Pediococcus* (34- 42 %). Le pourcentage de G-C des espèces du genre *Lactobacillus* est très hétérogène et varie d'une espèce à une autre de 32 à 53 %. Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou

Streptococcus, dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 %, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus*, et séparées de la branche des *Actinomycetales* au G-C % supérieur à 50 %, comprenant *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Bekhouche, 2006) (figure 2).

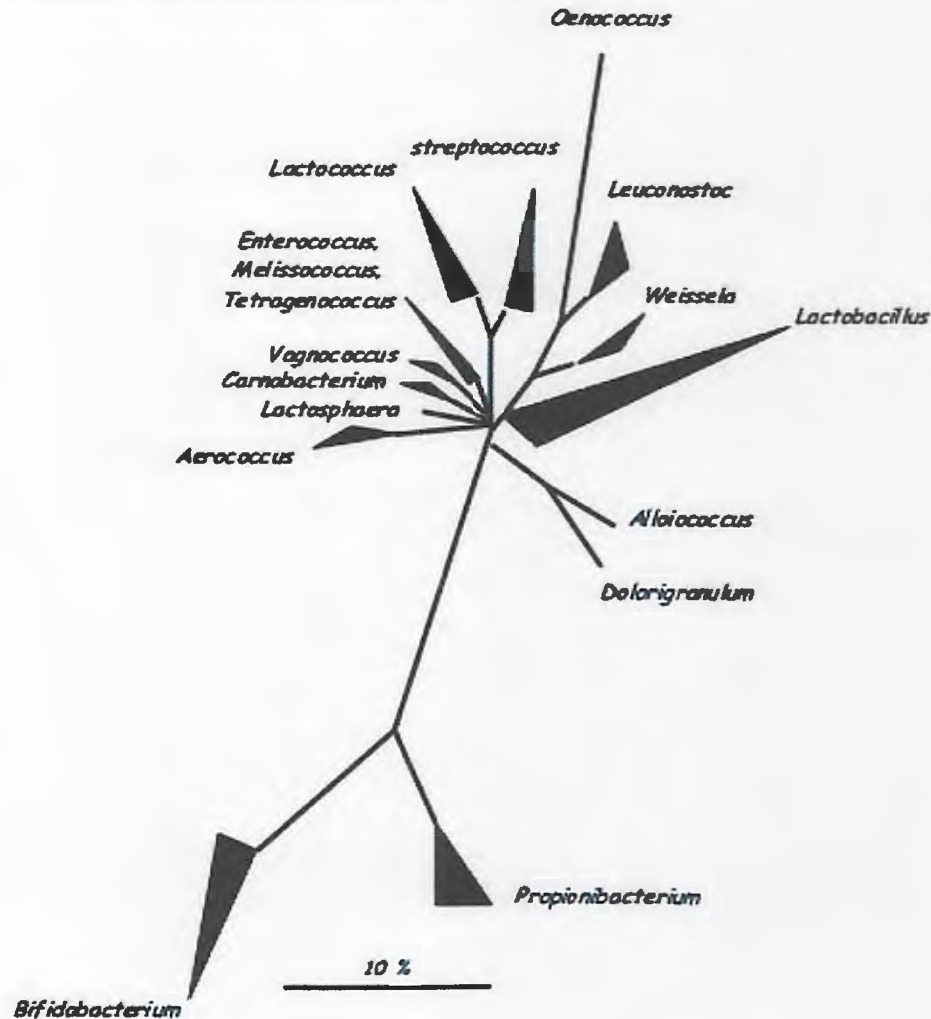


Figure 02: Arbre phylogénétique basée sur l'analyse comparative du gène ARN-16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage GC dans l'ADN et les bactéries Gram + du genre *Bifidobacterium* et la *Propionibacterium* (Givry, 2006).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize (13) genres bactériens différents : *Lactobacillus* (Lb), *Bifidobacterium* (B), *Leuconostoc* (Ln), *Lactococcus* (Lc), *Enterococcus* (En), *Streptococcus* (S), *Pediococcus* (Pc), *Carnobacterium* (C), *Oenococcus* (Oc), *Weissella* (W), *Aerococcus* (Ac), *Tetragenococcus* (Tc), *Vagococcus* (V) (Dortu et Thonart, 2009). À côté de ces genres, on a aussi : les bactéries propioniques représentées par le genre *Propionibacterium* (Ouwehand, 2004). Ces bactéries font partie des bactéries lactiques grâce à leurs propres caractéristiques qui sont semblables à celles des bactéries lactiques (tableau 1 et 2).

Tableau 01: principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques. B : bacilles ; C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces (Baliarda, 2003).

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrade	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+/-	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	LD	D,L, DL	L	L	L	D	L, DL	L,	L	+/-

5. Les différents genres des bactéries lactiques

5.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles souvent allongés, parfois groupés en paires ou en chaînes. Ils sont catalase négative (-) (certains ont une pseudo-catalase mais comme les pediococques sont benzidine -), microaérophiles ou anaérobies.

Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ à côté de l'acide lactique. Les lactobacilles homofermentaires obligés (exemple *Lb. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse, les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (exemple : *Lb. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses. Ce genre a été subdivisé par Orla Jensen en trois groupes (Guiraud, 1998) (tableau 3).

Tableau 02: Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Sutrat et al., 1998)

Genres	Morphologies	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétéro fermentaires	Psychrophiles	6
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles ou Thermophiles	19
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	13
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	2
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	7
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	1
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	1
<i>Bifidobacterium</i>	Formes irrégulières	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25
G : groupes.				

Groupe I: anciennement appelé *Thermobacterium*. Ces bactéries ont un métabolisme strictement homofermentaire (ni les pentoses, ni le gluconate ne sont fermentés). Ces bactéries possèdent une fructose 1-6-diphosphate aldolase et une phosphofructokinase. Elles se développent à 45°C mais pas à 15°C (Bourgeois et Larpent, 1996). Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. leichamni*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. kefirifaciens* et *Lb. mali* (Guiraud, 1998). La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux) et participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme (Sutrat et al., 1998).

Tableau 03: Critères différentiels des trois groupes de *Lactobacillus* (Bourgeois et Larpent, 1996).

	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
ADH	-	±	+
Glucose (gaz)	-	-	+
Glucosides	±	+	-
Gluconate (gaz)	-	+	+
Aldolase	+	+	-
Pentoses	-	±	±
Thiamine	-	-	+
Acide lactique	DL ou L	D ou DL	DL
G+C %	34,7-50,8	33-46,4	35-53,4

Groupe II : anciennement appelé *Streptobacterium* (Bourgeois et Larpent, 1996). Il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15°C (ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat). Il comporte les espèces *Lb. casei* qui est le lactobacille prédominant du lait, *Lb. plantarum* rencontré dans la choucroute, *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. acetotolerans*, *Lb. graminis*, *Lb. Rhamnosus*, ... etc. (Guiraud, 1998).

Groupe III : anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire (Bourgeois et Larpent, 1996). C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Sutrat et al., 1998).

5.2. Les Streptocoques lactiques : Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *Sc. Agalactiae*, d'autre sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*Sc. mutans*) (Sutrat et al., 1998). Ce sont des germes anaérobies facultatifs, ont une forme cocci, généralement microaérophiles et très exigeantes de point de vue nutritionnel. La plupart des espèces ne sont pas en général capsulées, leur fermentation est homolactique (Guiraud, 1998). Ces espèces se différencient principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield et par leur capacité de croître à des températures extrêmes, 45°C pour les thermophiles, 10°C pour les mésophiles (Leveau et Bouix, 1993). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie essentiellement des autres streptocoques par son habitat (lait et produits laitiers), son caractère non pathogène (Sutrat et al., 1998), sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43°C, sa thermorésistance à 60°C (parfois 65°C) pendant 30 minutes avec une activité fermentaire le plus souvent réduites à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl (Leveau et Bouix, 1993). Du fait de ces propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Sutrat et al., 1998).

5.3. Le genre *Lactococcus*

Traditionnellement, les streptocoques lactiques mésophiles regroupent deux espèces : *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*. Sutrat et al., (1998), ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (Leveau et Bouix, 1993). Le genre *Lactococcus* appartient au groupe N de Lancefield, ce genre regroupe, *Lc. lactis*, *Lc. graviae*, *Lc. pseudoplantarum* et *Lc. raffinolactis* (Bourgeois et Larpent, 1996). Les cellules de ces bactéries normalement sphériques peuvent quelques fois s'allonger, elles sont homofermentaires produisant de l'acide lactique L(+) (Leveau et Bouix, 1993), car elles sont associées à de nombreuses fermentations alimentaires. Elles sont mésophiles (leur croissance optimale est à température moyenne de 20°C à 30°C, mais se développent jusqu'à 10°C). Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers. Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce qui possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre *Vagococcus* (Sutrat et al., 1998). Elles abaissent le pH en transformant le lactose en acide lactique et leur nombre des plasmides varie de 1 à 14 (Bourgeois et Larpent, 1996).

5.4. Le genre *Leuconostoc*

Les cellules de ce genre rassemblent les coques lenticulaires en paires ou chainettes, mésophiles. Elles se développent entre 20°C et 30°C pas à 45°C (Guiraud, 1998), possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide lactique (isomère D), de l'éthanol et du CO₂. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère

une activité aromatique importante. D'autre synthétise les dextrans en présence de saccharose (Sutrat et al., 1998). Elles sont anaérobies facultatifs, exigeantes de point de vue nutritionnel. Elles sont généralement capsulées, cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu (Guiraud, 1998). Ce genre comporte 3 espèces : *Ln. mesenteroides* (et ses 3 sous espèces), *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et une espèce acidophile *Ln. oenos* (Leveau et Bouix, 1993). Ces germes ne sont pas hémolytiques, ni pathogènes. Ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés ou les végétaux (Guiraud, 1998). Ils sont présents majoritairement dans les produits végétaux, mais ils sont également isolés dans les produits laitiers et le vin (Sutrat et al., 1998).

5.5. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le groupement en tétrades. Ils sont mésophiles, microaérophiles, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose (Sutrat et al., 1998). Leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance (Guiraud, 1998). Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevés, comme *P. halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl. Ils sont présents dans la bière, le vin, les produits végétaux et les saumures (Sutrat et al., 1998). Les pédiocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les *Aerococcus* sont proches des *Pediococcus* (Guiraud, 1998).

5.6. Le genre *Carnobacterium*

Carnobacterium est un lactobacille hétérofermentaire contaminant les viandes et les poissons (Guiraud, 1998). Ce genre a été créé par Sutrat et al., (1998) pour regrouper des lactobacilles atypiques isolés de viande de bœuf, de poisson et de volaille emballés sous vide et stockés à basse température (Leveau et Bouix, 1993). Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*. Morphologiquement proches des *Lactobacillus* (bacilles parfois très courts, ils s'en différencient par leur tendance psychrotrophes et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique. De même leur peptidoglycane est constitué d'acide meso-diaminopimélique alors qu'il est caractérisé par le dipeptide Lys-Asp chez la plupart des *Lactobacillus* (Sutrat et al., 1998). La croissance est possible à 0°C et 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de NaCl 8%, ni sur milieu à l'acétate (Bourgeois et Larpent, 1996). Ce genre comprend 4 espèces, *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum* (Sutrat et al., 1998).

5.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le rattachement de ce genre aux bactéries lactiques proprement dites peut se justifier par son ancien classement dans les *Lactobacillus* sous le nom de *Lb. bifidus* mais surtout par l'existence chez cette bactérie d'une fermentation lactique. En fait, *Bifidobacterium* produit plus d'acide acétique (rapport 3:2), de faibles quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique et ne produit pas de CO₂ comme une bactérie hétérolactique (Leveau et Bouix, 1993). Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes, coccoidales, cellules ramifiées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposée en V ou en palissade. Ces bactéries sont immobiles, non acido-alcool résistants, non sporulées, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l'oxygène en présence de CO₂ (Bourgeois et Larpent, 1996). Ce sont des bactéries mésophiles montrant une température optimale de croissance entre 37 et 41°C. Elles ne supportent pas les pH acides, 5,0-4,5 (Leveau et Bouix, 1993). Chez l'homme, les *Bifidobacterium* sont des commensaux de la bouche, de l'intestin, des branches et de vagin. Chez l'animal, ils sont surtout mis en évidence dans la flore intestinale (Bourgeois et Larpent, 1996).

Le *Bifidobacterium* est utilisé dans certains yaourts (probiotiques). Sa présence entrainerait un effet anti-infectieux au niveau intestinal à cause de la présence d'un facteur bifidogène. *Bifidobacterium* est phylogéniquement proche des actinomycètes alors que les autres bactéries lactiques sont proches des clostridies (Guiraud, 1998). Les cellules de *Bifidobacterium* se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur C+G% élevé, et la présence d'une enzyme la fructose-6-phosphate phosphocétolase (Sutrat et al., 1998).

5.8. Le genre *Propionobacterium*

Les bactéries propioniques étaient décrites pour la première fois par Freudenreich et Jensen à 1906 ce dernier (Jensen) qui a donné le nom *Propionibacterium* en 1909. Les bactéries propioniques sont Gram positif, asporulées, immobile, de formes variables. Bien que quelques souches puissent être relativement des aérotolérantes mésophiles, d'autres sont fondamentalement anaérobies produisant de large gamme de l'acide propionique, de l'acide acétique et du CO₂ comme leurs principaux produits fermentaires des sucres et d'acide lactique (Marth et Steele, 2001). Leur température optimale de croissance comprise entre 30°C et 37°C. Les bactéries propioniques sont subdivisées en deux principaux groupes: le groupe classique ou laiterie PAB et le groupe cutané (Ouwehand, 2004). L'habitat principal pour les bactéries propioniques classiques (laiteries) est les produits laitiers, particulièrement dans le fromage Swiss-type, cependant, on peut les trouver dans le contenu ruminal, olives et jus d'oranges altérés, par contre l'habitat principal pour les bactéries propioniques cutanées est la peau humaine (la microflore normale humaine), elles peuvent être aussi isolées à partir des selles humaine, les poulets et les porcs (Ouwehand, 2004) (tableau 4).

Tableau 04: représente les deux groupes des espèces *Propionibacterium* (Ouwehand, 2004).

Le groupe classique	Le groupe cutané
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. australiense</i>	<i>P. avidum</i>
<i>P. cyclohexanicum</i>	<i>P. granulosum</i>
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	<i>P. lymphophilum</i>
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. propionicus</i>
<i>P. jensenii</i>	
<i>P. thoenii</i>	
<i>P. microaerophilum</i>	

6. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

6.1. Les méthodes classiques

Le milieu de Man, Rogosa et Sharpe « MRS » est le plus utilisé pour l'isolement et le dénombrement des *Lactobacillus* et de la plupart des autres bactéries lactiques (*Bifidobacterium*). Ainsi que les milieux Elliker (*Lactococcus*) et M17 (*Streptococcus thermophilus*). Sur ces milieux, les bactéries lactiques forment des petites colonies (2 à 3mm de diamètre) blanches à crème, bombées. L'appartenance au groupe se fait sur la base de la coloration de Gram positif, de la catalase et oxydase négatives et éventuellement l'absence de réduction des nitrates (Sutrat et al., 1998).

6.2. Les méthodes moléculaires

Les méthodes classiques d'identification constituent un niveau parfois insuffisant de caractérisation. L'identification de la souche passe par l'utilisation d'au moins deux méthodes moléculaires de référence: l'hybridation ADN/ADN et la comparaison de la séquence

nucléotidique de certains gènes (ARN 16S ou région inter géniques (16S-23S, 23S-5S) avec une souche type ou des souches de référence (Corrieu et Luquet, 2005).

7. Les propriétés technologiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes (Tabak et Bensoltane, 2011). Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente (Badis A. et al., 2005).

7.1. L'aptitude acidifiante

L'activité acidifiante est une des principales fonctions des bactéries lactiques, elle peut être caractérisée par (Corrieu et Luquet, 2005; Nguyet, 2008).

- ❖ Le pH final ou la production d'acide lactique ;
- ❖ La cinétique d'acidification ;
- ❖ La post-acidification.

Les conséquences du processus d'acidification, d'ordre physico-chimique et microbiologique sont (Corrieu et Luquet, 2008)

- ❖ Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- ❖ Abaissement progressif du pH des milieux de cultures et des matrices alimentaires ;
- ❖ Limitation des risques de développement des flores pathogènes et de flores d'altérations dans les produits fini.

7.2. Activité protéolytique

Du fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des bactéries lactiques dans un milieu pauvre en ces acides repose en grande partie sur leur système protéolytique selon les étapes suivantes (Corrieu et Luquet, 2008 ; Roudj et al., 2009):

- ❖ Le système multiprotéique fait intervenir en premier lieu une protéase de paroi puis différents systèmes de transport d'acides aminés et de peptides ;
- ❖ Après internalisation, ces peptides sont hydrolysés par des peptidases de nature et de spécificité variées ;
- ❖ Libération d'acides aminés.

7.3. Activité lipolytique

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire, elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés. D'une manière générale on distingue (Corrieu et Luquet, 2008) :

- ❖ **Les estérases:** hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C₂-C₈) ;
- ❖ **Les lipases:** actives sur des substances émulsifiées contenant des acides gras à chaîne longues (>C₈), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides.

7.4. Activité aromatisante

Le catabolisme des acides aminés et des lipides contribue à la formation de nombreux composés d'arôme dont les principaux sont:

- ❖ **Diacétyl:** c'est un arôme volatile présent dans les fromages frais, le beurre, la crème fraîche et les laits fermentés obtenus par action des bactéries lactiques mésophiles ;
- ❖ **Acétaldéhyde:** c'est un composé très volatile et son impacte aromatique s'exprime dans le yaourt (Corrieu et Luquet, 2008).

7.5. Propriété texturante

Les propriétés texturantes des bactéries lactiques sont principalement utilisées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés. La présence d'exopolysaccharides a pour effet de réduire la synérèse lors du stockage au froid des produits fermentés et d'améliorer les propriétés mécaniques des gels lactiques en augmentant leur texture et leur viscosité (Corrieu et Luquet, 2008).

7.6. Production des substances inhibitrices

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les substances antimicrobiennes permet à ces bactéries de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire (Nguyet, 2008). Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. (Dortu et Thonart, 2009).

8. Utilisations des bactéries lactiques

8.1. Domaine alimentaire

8.1.1. Rôle sur la structure et la texture

Dans les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé plus ou moins ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé, kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée, l'utilisation de souches plus ou moins acidifiantes peut être combinée à celle de souches productrices de polysaccharides (Sutrat et al.,1998).

8.1.2. Rôles dans la conservation

- ❖ **Production d'acide lactique :** les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.
- ❖ **Production de bactériocines :** ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur les bactéries à Gram positif (Sutrat et al.,1998).

8.1.3. Rôles sur les caractéristiques organoleptiques

Dans la plupart des denrées où elles interviennent, les participent ou sont responsables des caractéristiques organoleptiques finales des produits. En dehors de l'acide lactique et d'autres acides organiques produits par fermentation qui confèrent aux produits leur caractère acide, tels que le diacétyle et l'acétaldéhyde, qui sont responsables notamment des saveurs caractéristiques du beurre et du yaourt (Sutrat et al., 1998).

8.2. Domaine sanitaire ou l'effet probiotique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent être utilisées comme probiotiques et peuvent jouer plusieurs rôles bénéfiques sur l'organisme à savoir :

- ❖ L'amélioration de la digestibilité du lactose;
- ❖ L'abaissement du taux de cholestérol sanguin;
- ❖ Des effets sur l'activation du système immunitaire;
- ❖ L'inactivation de composés toxiques et la protection contre certaines infections intestinales (Sutrat et al., 1998).

Chapitre 2 : Les probiotiques



1. Historique de la définition des probiotiques

Le terme probiotique est un mot relativement nouveau, dérivé des deux mots grecs *pros* et *bios* qui signifient littéralement pour la vie ou en faveur de la vie contrairement au terme antibiotique signifiant contre la vie. (Amrouche, 2005) et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (Farineau, 2001). L'observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribuée à Eli Metchnikoff (1907) d'origine russe, lauréat du Prix Nobel qui travaillait à l'Institut Pasteur au début du siècle dernier et qui a suggéré que la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles (Farineau, 2001).

Lilly et Stilwell (1965) ont proposé que le mot "probiotique" désigne des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d'autres microorganismes (Farineau, 2001).

Parker (1974) élargit cette définition à des organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore (Corrieu et Luquet, 2005).

Fuller (1989) a défini les probiotiques par suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants qui influent de façon favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Tredez, 2008).

Fuller (1991) des microorganismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale (Corrieu et Luquet, 2005).

La FAO (Food and Agriculture Organisation) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé, 2001) formulent la définition suivante microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, comme partie d'un aliment, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte (Farineau, 2001).

Donc, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur l'organisme hôte en améliorant les propriétés de sa flore intestinale. Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaires sous forme lyophilisée. Les microorganismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques, même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués (Robin et Rouchy, 2001).

2. Les différents groupes de probiotiques

2.1. Les ferments lactiques

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie : les lactobacilles (*Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus caséi*) et les coques (*Enterococcus* et *Streptococcus*) (Robin et Rouchy, 2001)

2.2. Les bifidobactéries

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. La population de *Bifidobacterium* diminue avec l'âge et leurs espèces varient selon l'âge (Robin et Rouchy, 2001).

2.3. Les différentes levures de type *Saccharomyces*

Elles sont principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire, comme *S. boulardii* et *S. cerevisiae*

2.4. Les autres bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis* et *B. cereus*.

Les genres bactériens et les levures les plus utilisés sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium* et *Saccharomyces* (Robin et Rouchy, 2001).

3. Critères de sélection

La sélection d'un probiotique, c'est-à-dire d'un mélange de plusieurs souches ou espèces bactériennes, est réalisée soit :

- ❖ Par l'utilisateur potentiel,
- ❖ Par le producteur de ferments,

Cette sélection s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois à la spécification demandée par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur (Luquet et Corrieu, 2008).

Tableau 05: Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (Alerge, 2009).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Historique de non pathogénicité (GRAS) ▪ Souche d'origine humaine ou alimentaire ▪ Souches caractérisées par des méthodes phénotypiques et génotypiques ▪ Souche déposée dans une collection de culture internationale ▪ Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques ▪ Pas de déhydroxylation des sels biliaires
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tolérance à l'acidité gastrique ▪ Tolérance à la bile ▪ Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production des substances antimicrobiennes (bactériocines) ▪ Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et /ou au mucus ▪ Stimulation de système immunitaire
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini ▪ Conservation des propriétés probiotiques après production

4. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes...etc.). Jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif. Ils peuvent avoir des effets soit directs soit indirects en agissant via des modifications de l'immunité et de la flore. Ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité de la ration alimentaire et en stimulant

l'immunité. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (**Robin et Rouchy, 2001**).

5. Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques :

5.1. Amélioration de la digestion du lactose

- ❖ Par l'action de la β -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle.

5.2. Diminution des allergies alimentaires

- ❖ Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale ;
- ❖ Stimulation du système immunitaire.

5.3. Réduction du risque des diarrhées

- ❖ Résistance à la colonisation par des pathogènes ;
- ❖ Stimulation du système immunitaire.

5.4. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin

- ❖ Modulation de la flore intestinale ;
- ❖ Stimulation du système immunitaire.

5.5. Réduction du cholestérol

- ❖ Assimilation du cholestérol ;
- ❖ Déconjugaison des sels biliaires.

5.6. Prévention du cancer du côlon

- ❖ Stimulation du système immunitaire ;
- ❖ Production de composés antimutagéniques ;
- ❖ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ;
- ❖ Dégradation de carcinogènes ;
- ❖ Élimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes (**Alerge, 2009**).

6. Les facteurs qui influencent l'effet probiotique des bactéries lactiques

6.1. Genres ou les souches probiotiques

Le terme de probiotiques regroupe en réalité une multitude de microorganismes, qui se répartissent en genres (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*), puis en espèces (*Lactobacillus casei*...) et enfin en souches. Ces classifications scientifiques sont très complexes car les bactéries ne sont pas classées et nommées en fonction de leur structure constitutive mais en fonction de leurs effets (comment elles sont faites), c'est à dire de leur activité. Donc, les effets bénéfiques des probiotiques reconnus concernent un ou plusieurs types de bactéries très précis. En effet les microorganismes d'une même souche n'auront pas forcément le(s)même(s) effet(s) sur la santé, ni même un effet du tout (**Quillien, 2001**).

6.2. Mode d'administration

Les probiotiques n'auront pas nécessairement les mêmes effets selon la forme sous laquelle ils sont commercialisés donc consommés (**Quillien, 2001**).

6.3. Catégories de population

Etant donné le fait que chaque individu possède une flore intestinale propre, un même probiotique n'aura pas nécessairement la même efficacité chez tous les individus. En particulier, l'âge de la personne va jouer un rôle déterminant. Ainsi certaines bactéries lactiques testées n'ont pas eu d'effet que chez les nouveau-nés et très jeunes enfants. C'est le cas de celles qui réduisent la durée des diarrhées. Les personnes âgées sont également une cible particulière en raison de l'affaiblissement de l'ensemble de leur organisme. Un programme de recherche sur la manière dont les probiotiques peuvent être bénéfiques aux personnes âgées est en cours. Des contraintes techniques liées à la fabrication industrielle et à la commercialisation de produits à base de probiotiques.

Pour être commercialisées sous forme de produit alimentaire, les bactéries lactiques sélectionnées doivent pouvoir être :

- ❖ Produites industriellement, en très grande quantité,
- ❖ Survivre aux phases de transport,
- ❖ Pouvoir se conserver sur les rayons des magasins et chez le consommateur,
- ❖ Elles doivent survivre et garder leur effet probiotique pendant tout ce temps et dans des conditions qui ne sont pas celles, optimales, du laboratoire.

Des projets de recherche visent donc à définir les conditions technologiques à réunir pour permettre la mise sur le marché d'un produit contenant des bactéries lactiques probiotiques vivantes et actives. Il s'agit de sélectionner des souches de bactéries suffisamment résistantes et de définir les procédés industriels adéquats (**Quillien, 2001**).

Chapitre 3 : Le rumen

1. Introduction

Chez le ruminant, encore plus que tout autre animale, le rôle de la flore digestive dans la fonction de nutrition est capital. Il existe une relation de dépendance très forte entre la micropopulation du rumen et l'animal hôte (**Gouet, 1986**). Cette relation est majoritairement de nature symbiotique. La biomasse végétale qui arrive dans le rumen pour satisfaire les besoins de l'animal, est en fait d'abord mise à disposition de cette micropopulation qui l'utilise comme substrat pour se multiplier. Lorsqu'un ruminant s'alimente, il satisfait d'abord les besoins de la microflore et seuls les éléments non fermentés, les produits terminaux des fermentations et les corps microbiens sont digérés. Ils participent alors à la satisfaction du besoin propre de l'animal hôte. Le rumen est un fermenteur, dont la régularité des processus est entretenue malgré un contenu qui varie en fonction de l'animal et de la nature de la ration. Le contenu ruminal peut être caractérisé par quelques paramètres physico-chimiques.

1. Caractéristiques physico-chimiques du rumen

Le rumen est un biotope complexe, approprié au développement symbiotique de la flore intestinale et de l'animal hôte. Il est constitué de 85 à 90% d'eau. Sa température varie peu, elle est comprise entre 39 et 41°C. Son pH est plus variable, il est normalement compris entre 6 et 7, mais il atteint parfois des valeurs supérieures à 7.5 ou inférieures à 5, surtout après l'ingestion d'une ration à base de concentré (**Theodorou, 1993**). Dans le rumen l'O₂ est quasiment absent, ce qui permet le développement d'une flore anaérobie ruminale repose sur les fermentations lactique et propionique et la méthanogénèse (**Doelle, 1969**).

Anatomiquement, le rumen est constitué de : rumen, réseau, feuillet et caillète (figure 3).

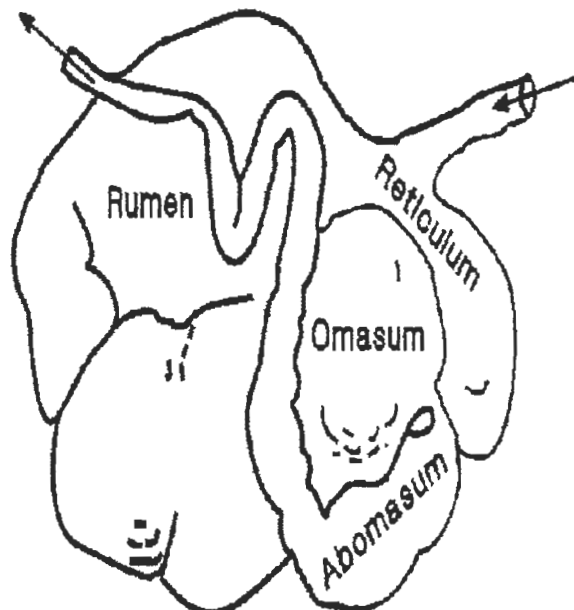


Figure 03 : Les différentes parties du rumen.

2. Description de la microflore ruminale

Les communautés microbiennes qui peuplent le biotope digestif des ruminants appartiennent aux trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya. Des représentants du monde viral sont également présents (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**).

2.1. Les bactéries

La population bactérienne est de loin la plus complexe (plus de 200 espèces), la plus dense (de l'ordre de 10 milliards de bactéries par millilitre du contenu du rumen), elles représentent la moitié de la biomasse microbienne (**Jarrige, 1988 ; Fonty et al., 1994**). La majorité est constituée d'anaérobies stricts, mais il existe également des anaérobies facultatifs qui représentent 10^7 - 10^8 cellules/g du contenu du rumen. La taille des bactéries du rumen est généralement de 0.5 à 10 μm . Les bactéries Gram-négatif sont les prédominantes, les Gram-positif sont ainsi présentes, et jouent des rôles très importants (**Kamara, 2005**).

Les bactéries ruminales ont été classées en quatre groupes, en fonction de leur localisation dans le rumen (**Fonty et Forano, 1999; Guillaume, 2007**) : Les bactéries vivant libres, associées à la phase liquide ruminal : c'est le cas de nombreuses espèces bactériennes fermentaires qui consomment des substrats solubles, et de nombreux protozoaires qui ingèrent des particules alimentaires (**Fonty et Forano, 1999**). Les bactéries associées avec les particules alimentaires : à la surface des particules alimentaires se forme ainsi un **consortium microbien** (biofilm) au sein duquel cohabitent plusieurs espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons. (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**). Les bactéries associées à l'épithélium ruminal : sont principalement des anaérobies facultatives Gram-positif, immobiles et utilisent l'oxygène qui arrive dans le rumen via la circulation sanguine (**Jouany, 1994 ; Guillaume, 2007**). Les bactéries attachées à la surface des protozoaires : ces bactéries présentent 1-10% de la flore totale du rumen. Le nombre des bactéries fixées sur chaque protozoaire dépend de la taille de ce dernier (**Allison et al., 2007**). En plus, les bactéries ont été classées selon leur aptitude à dégrader et à fermenter les substrats en :

2.1.1. Les bactéries cellulolytiques

Les bactéries cellulolytiques apparaissent dans le rumen trois à quatre jours après la naissance de l'animal et leur nombre varie de 10^2 à 10^7 bactéries/ml (**Fonty et al., 1988 a**).

Deux types de bactéries cellulolytiques sont trouvés dans le rumen :

- ❖ **Des coques : représentés** par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*. Toutes les souches de *R. flavefaciens* et *R. albus* dégradant la cellulose, le cellobiose et le xylane (**Guillaume, 2007 ; Graham et Malcolm, 1979**).
- ❖ **Des bacilles** : parmi lesquelles sont majoritairement isolées *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrosolvens* dont les lactobacilles (le nombre peut dépasser 10^6 par ml), surtout abondants, d'une part, chez les jeunes veaux et, d'autre part, lorsque le régime comprend beaucoup de foin et des fourrages concentrés.
Précisons que les principaux produits du métabolisme sont l'acide succinique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide butyrique, H_2 et CO_2 . La plupart des bactéries cellulolytiques du rumen produisent des enzymes capables d'hydrolyser les hémicelluloses. Il semble que *Butyrivibrio fibrosolvens* est l'élément essentiel de la dégradation des hémicelluloses (**Williams et Withers, 1981**).

2.1.2. Les bactéries pectinolytiques

La bactérie pectinolytique par excellence est *Lachnospira multiparus* qui se présente sous la forme de bacilles incurvés Gram positif, d'autres bactéries pectinolytiques

comprenant : *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis* et *Succinovibrio dextrinosolvens* (Jouany, 1994).

2.1.3. Les bactéries amylolytiques

Un certain nombre des bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques. Les espèces non cellulolytiques *S. bovis*, *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *S. amylolytica* et *S. ruminantium* comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon (Guillaume, 2007).

2.1.4. Les bactéries utilisatrices des glucides simples

Au sein de la microflore ruminale, un nombre important d'espèces bactériennes sont capables de dégrader les glucides simples. Chez les animaux recevant de grandes quantités de glucides rapidement fermentescibles, les lactobacilles prolifèrent souvent, en compagnie de *S. bovis*, créant ainsi des conditions de milieu très acides (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

2.1.5. Les bactéries protéolytiques

Près de la moitié (entre 30 et 50%) du total des bactéries viables isolées du rumen peuvent être protéolytiques. L'activité protéolytique de la flore du rumen, qui est au final très faible en dépit de son importance dans la nutrition, est donc due à l'activité d'un grand nombre d'espèces présentant une activité faible (Wallace et Cotta, 1988).

2.1.6. Les bactéries lipolytiques

Un certain nombre de bactéries ruminales impliquées dans l'utilisation des lipides présents dans le rumen. *Anaerovibrio lipolytica* est la bactérie la mieux connue pour son activité lipasique (Guillaume, 2007).

2.1.7. Les bactéries uréolytiques

Selon Wallace et Cotta (1988), deux groupes bactériens se partageaient l'activité uréolytiques. Tout d'abord, une population nombreuse d'anaérobies stricts avec une activité uréasique faible, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Succinovibrio*. D'autre part, on trouverait également une population nettement plus faible d'anaérobies facultatifs et beaucoup plus spécifiquement uréolytiques, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Corynebacterium* (Griswoold et Mackie, 1997).

2.1.8. Les bactéries de grande taille

Celles-ci ne sont pas isolées par des méthodes de culture, mais sont fréquemment détectées lors d'examen au microscope du contenu ruminal. Les principaux organismes détectés sont notamment *Oscillospira guillermondi*, les ovales d'Etadie ou encore les ovales de Quin. Elles n'ont été que peu ou pas étudiées en culture pure, leur fonction et leur métabolisme sont donc mal connus (Guillaume, 2007).

2.2. Les Archaea (bactéries méthanogènes)

Il s'agit de bactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes ruminiaux (Demeyer et Fievez, 2000). Des études, basées sur la culture ou sur l'analyse moléculaire, ont montrées que les méthanogènes ruminiaux les plus communément isolés appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae* (Tokua et al., 1999). Il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter*. D'autres méthanogènes appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae* ont été isolées chez des

bovins et des ovins. Tandis que les Méthanogènes de la famille *Methanosarcinaceae* ont été trouvées chez les caprins et les ovins. Il s'agit de *Methanosarcina barkeri* (Demeyer et Fievez, 2000). Les Archaea occupent différentes localisations dans le rumen. On les trouve dans la phase liquide du contenu digestif mais beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés sur les particules alimentaires, ainsi que sur l'épithélium ruminal (Tokua et al., 1999).

2.3. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes unicellulaires, mobiles, dont on distingue deux types : les flagellés et les ciliés. Les ciliés représentent environ la moitié de la biomasse microbienne avec une concentration varie de 10^4 à 10^6 cellules /ml. La concentration des flagellés est plus faible (10^3 à 10^4 /ml) et leur rôle est mal connu (Jouany et Ushida, 1988). Les ciliés dont la tailles est importante (50 à 300 nm) (Kamara, 2005), sont divisés en deux groupes : Les holotriches, dont on distingue les genres *Isotricha* et *Dasytricha*, et les entodiniomorphes. Les ciliés sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries mais ils sont 10^4 fois moins nombreux. Ils sont soit fixés sur les particules alimentaires soit libres. Les holotriches utilisent essentiellement les glucides solubles, tandis que peu d'entodiniomorphes en sont capables (Ushida et al., 1991).

Les ciliés ont la capacité d'ingérer l'amidon sous forme de granules, ceci est essentiellement le fait d'*Isotricha*, ce qui contribue à limiter la chute de pH liée à la dégradation de l'amidon (Jouany et Ushida, 1988). Parmi les protozoaires ciliés modérément cellulolytiques, on note : *Eudiplodinium maggu*, *Epidinium eaudatum*, *Ostracodinium bovis*, *Orphrysolex caudatus* et *Polyplastron multivisculatum*. *Diplodinium pentacanthum* est considéré comme faiblement cellulolytique (Fonty et Forano, 1999). 10% de l'activité protéolytique et 30 à 40% de la fonction lipolytique est assurées par les protozoaires ciliés (Ushida et al., 1991).

2.4. Les champignons

Leur concentration est estimée à 10^3 et 10^5 zoospores /ml), soit environ 10% de la biomasse microbienne (Fonty et al., 1988 b). Ce sont des zoospores flagellés qui sont soit mono flagellés (*Neocallimastix* et *Piromyces*) soit pluri flagellés (*Caecomyces*) comme les bactéries cellulolytiques, les champignons apparaissent dans le rumen des animaux quelques jours seulement après la naissance. Les Champignons possèdent des activités hydrolytiques à l'égard de nombreux polymères structuraux (cellulose, hémicelluloses, pectine) (Grenet, 1997 ; Baucop, 1981). Les champignons semblent, en outre, capable de solubiliser *in vitro* une petite partie de la lignine des lignocelluloses pariétales mais ils n'utilisent pas ce composé comme source d'énergie (Akin et Benner, 1988).

2.5. Les bactériophages

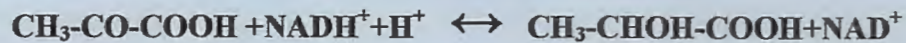
Une activité lytique a été mise en évidence à l'égard de *Streptococcus bovis*, *Bifidobacterium thermophilum*. Des phages filamenteux tempérés ont été mis en évidence dans diverses souches de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Klieve et al., 1989).

3. Les principales voies fermentaires ruminales et leurs métabolites

Les carbohydrates sont la source d'énergie première pour la croissance des microorganismes du rumen et la majorité des bactéries présentes fermentent ces sucres. Plusieurs modes de fermentations existent, notamment la fermentation lactique, propionique et la méthanogénèse entre autre (Doelle, 1969).

3.1. La fermentation lactique

Après la glycolyse, appelée aussi voie de Emben-Meyerhof-Parnas, une molécule de glucose subit une transformation en acide pyruvique (gain net : 2ATP). Deux molécules sont formées par molécules de glucose et sont réduites en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase selon la réaction:



En somme une bactérie ruminale métabolisant le glucose sur ce principe. Le produit est l'acide lactique qui rejeté dans le milieu (Hungate, 1966).

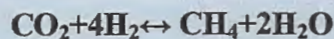
3.2. La fermentation propionique

Le propionate est le produit de fermentation de nombreuses bactéries anaérobies. En effet, la fermentation propionique à partir du glucose ou du lactate correspond aux bilans (Hungate, 1966).



3.3. La méthanogénèse

Les bactéries productrices de CH_4 (méthanogénèse) sont strictement anaérobies et appartiennent au groupe des archaebactéries (Hungate, 1966).



4. Utilisation des probiotiques chez le ruminant

Les probiotiques, chez les ruminants sont essentiellement utilisés dans le but d'apporter des microorganismes bénéfiques absents ou renforcement (reconstitution) de la flore normale du tractus digestif pour que les ruminants puissent bénéficier des effets favorables de ces derniers.

Les principaux effets qui ont été observés suite à l'ajout de probiotiques à la ration sont :

- ❖ Une augmentation du gain moyen quotidien de l'ordre de 2.5 à 5% en moyenne et de l'indice de consommation (kilos de gain/kilos de matière sèche consommée) (Kreihbel et al., 2003).
- ❖ Une augmentation de la population bactérienne en présence de levures conjointement à une augmentation de la digestibilité des aliments ;
- ❖ Les bactéries probiotiques joueraient un rôle d'atténuer les symptômes de désordres digestifs tel que l'acidose (Al-Dobaib et Mousa, 2009).

5. Les interactions microbiennes dans le rumen

Ces interactions conditionnent également la nature des métabolites terminaux des fermentations dont le ruminant est dépendant dans sa nourriture.

Tableau 06: Exemple d'interactions microbiennes au sein de l'écosystème ruminal (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Type d'interaction	Définition	Exemple observés dans le rumen
Mutualisme	Les deux partenaires en tirent profit	Transfert interspécies d'H ₂
Synergisme	Les deux partenaires en tirent profit	Nutrition croisée : métabolisme des acides aminés, des cellodextrines
Antagonisme	Un ou les deux partenaire(s) souffre(nt)	/
Compétition	Dépendance des deux espèces pour un nutriment induisant une limitation mutuelle	Dégradation de la cellulose par <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefaciens</i> et <i>Fibrobacter succinogens</i>
Amensalisme	Suppression d'une espèce par un agent toxique produit par une autre espèce	Production des bactériocines
Prédation	Ingestion d'une espèce par une autre espèce	Ingestion des bactéries par des protozoaires
Parasitisme	Dérivation de nutriments des cellules d'une espèce au profit d'une autre espèce	/

II. Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel. Il a pour objectif de recouvrir les points suivants:

- ❖ Isolement, purification et identification de la microflore lactique du rumen de la chèvre de la région de Djimla afin de sélectionner des souches potentiellement probiotiques ;
- ❖ Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques locales : activité protéolytique, pouvoir texturant et pouvoir acidifiant ;
- ❖ Evaluation des aptitudes probiotiques *in vitro* : Résistances aux milieux acides, activité antibactérienne « antagonisme microbien », la résistance aux antibiotiques.

1. Matériel

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le matériel suivant :

1.1. Le rumen

La niche écologique utilisée est le rumen. Pour l'isolement et l'identification des bactéries lactiques, on a utilisé un échantillon global, composé d'une partie du rumen d'une chèvre de sexe masculin.

1.2. Les souches bactériennes indicatrices

Une souche d'*Escherichia coli* a été utilisée pour l'étude des interactions microbiennes.

1.3. Disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, cinq(5) antibiotiques (Institut Pasteur d'Alger) ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de l'Ampicilline (AM10), Erythromycine (E15), Pénicilline G (P10), Streptomycine (S500), Tétracycline TE30).

1.4. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- ❖ Milieux MRS (Man-Rogosa-Sharp) liquide et gélose: utilisé pour la culture des bactéries lactiques; (préparé au laboratoire) ;
- ❖ Milieu Y.M.A (Yeats Milk Agar) : utilisé pour la recherche de l'activité protéolytique des bactéries lactiques (préparé au laboratoire);
- ❖ Gélose hypersaccharosée : pour l'étude de la production des exopolysaccharides (préparé au laboratoire) ;
- ❖ Milieux GIBSON et ABD EL MALEK : pour la recherche de type fermentaire (préparé au laboratoire) ;
- ❖ Bouillons MRS pH 2, pH4 et pH 6.5 : pour la réalisation des tests de résistance à l'acidité;
- ❖ Gélose Mueller Hinton pour réaliser l'antibiogramme;
- ❖ Gélose nutritive (GN) pour réaliser le test d'interaction;
- ❖ Bouillon à Arginine DiHydrolase (ADH) : Pour la recherche de l'arginine dihydrolase ;
- ❖ Bouillon à Ornithine Décarboxylase(ODC): Pour la recherche de l'ornithine décarboxylase ;
- ❖ Bouillon à Lysine Décarboxylase (LDC) : Pour la recherche de lysine décarboxylase ;

- ❖ Milieu M.E.V.A.G sans sucre (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) pour la réalisation des profils de fermentation des sucres ;
- ❖ Le lait écrémé à 12% pour l'étude du pouvoir acidifiant ;

1.5. Les sucres

Pour établir le profil fermentaire des souches on utilisé les 13 sucres suivants : Cellobiose, Xylose, Maltose, Tréhalose, Sorbose, Mannose, Salicine, Saccharose, Dulcitol, Dextrine, Adonitol, Raffinose, Inositol (**Institut Pasteur d'Algérie**).

1.6. Autres produits chimiques et réactifs

Lors de cette étude, les produits suivants ont été utilisés :

- ❖ Le Violet de Gentiane, La fushine, Le lugol et l'alcool pour la coloration de Gram;
- ❖ La soude dornic (N/9) et phénophtaléine 1% pour la détermination de l'acidité;
- ❖ L'huile à immersion pour l'observation microscopique ;
- ❖ L'huile de vaseline stérile pour réaliser l'anaérobiose ;
- ❖ Tween 80 additionné au milieu MRS ;
- ❖ Eau oxygéné pour le test de la catalase.

1.7. Appareillage et autres : L'appareillage utilisé est le suivant :

- ❖ Spectrophotomètre (Shimadz);
- ❖ Bain marie (Heidolph);
- ❖ Balance (Denver);
- ❖ Plaque chauffante (Heidolph), agitateur magnétique;
- ❖ Étuve (37°C, 44°C) (Memmert);
- ❖ Four Pasteur (Controls);
- ❖ Microscope optique (Motic);
- ❖ Réfrigérateur (Condor);
- ❖ pH mètre (Hanna) ;
- ❖ Vortex (IKA);

2. Méthodes

2.1. Evaluation de la microflore lactique du rumen

2.1.1. Récupération de l'échantillon

- ❖ L'échantillon sur lequel on a mené notre travail est composé d'une partie du rumen de la chèvre (bouc). Ce dernier a été abattu au sein de Souk **Tamenthouth** de **Djimla**. Cette partie ruminale est ramenée au niveau de laboratoire de microbiologie- université de Jijel.

2.1.2. Préparation de la solution mère et la série des dilutions

- ❖ Le point de départ de notre travail est la préparation de la solution mère et la série des dilutions dont l'objectif est l'isolement et l'identification de la flore lactique existante mais cultivable et qui pourrait avoir des potentiels probiotiques.
- ❖ Avant d'entamer les techniques d'isolement et d'identification des flores cultivables, l'échantillon à analyser doit subir des dilutions décimales. On peut utiliser comme diluant de l'eau physiologique c'est-à-dire 9g/l de chlorure de sodium (**Corrieu et Leuquet, 2008**).

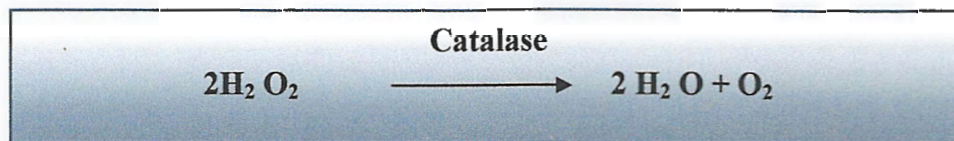
c) La croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation en milieu liquide (bouillon MRS), avec une culture pure de l'organisme à tester, les 19 tubes sont incubés pendant 7 à 10 (7jours) jours à 10°C (15°C) et 24 à 48 heures à l'autre température (45°C). Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen du milieu : présence de trouble. Les bactéries lactiques mésophiles poussent à 15°C alors que les bactéries lactiques thermophiles ne le font pas (Leveau et Bouix, 1991).

d) Tests biochimiques

1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme produite par plusieurs microorganismes pour la dégradation du peroxyde d'hydrogène en produisant l'eau et l'oxygène se qui traduit par l'apparition de bulles d'air qui confirme la présence de la catalase.



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

2. Recherche de l'arginine dihydrolase (système de l'arginine désaminase)

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques.

Cette enzyme est libère l'ammoniac et un composé intermédiaire, la citrulline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, on ensemence le boillon Moeller à arginine avec les 19 souches à tester, on incube à 37°C pendant 24h. La culture dans le milieu se manifeste par un virage du violet au jaune de l'indicateur du pH dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et libération d'ammoniac empêche le virage au jaune (Leveau et Bouix, 1991).

3. Recherche de type fermentaire (Guiraud, 1998 et Sharpe, 1979)

On définit de façon simple par le test de Gibson et Abd El Malek qui traduit un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétérofermentaire. On a préparé le milieu de culture Gibson et Abd El Malek dans des tubes à essai préalablement fondu, refroidi et solidifié en position verticale est ensemencé par les souches, puis on a coulé en surface un bouchon de gélose blanche stérile. Après une incubation à 37°C pendant 3 à 7 jours, 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 la gélose blanche vers le haut de tube.

4. Profil de la fermentation des sucres (Guiraud, 1998)

Il est mis en évidence sur un milieu de fermentation spécial pour les lactobacilles, additionné de 0.5% de substrat stérile et incubé à 37°C pendant 24-48 heures. Ce test permet d'apprécier le pouvoir fermentaire des souches de quelques sucres (Cellobiose, Xylose, Maltose, Tréhalose, Sorbose, Mannose, Salicine, Saccharose, Dulcitol, Dextrine, Adonitol, Raffinose, Inositol).

Ce test est réalisé sur milieu MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) dans des microplaques. Pour effectuer ce test, on ajoute au milieu MEVAG fondu et refroidi à température ambiante de laboratoire quelques gouttes du sucre à tester, après l'homogénéisation du mélange, on a coulé les microplaques. Lorsque ces dernières (MP) sont refroidies et solidifiées, on aensemencé nos souches bactériennes. L'ensemencement se fait par piqûre centrale avec l'anse de platine chargée de la culture bactérienne à étudier. Pour réaliser l'anaérobiose, on a ajouté l'huile de vaseline stérile. Après 24h d'incubation, le développement de la lecture et le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu se traduisent l'utilisation du sucre.

5. Identification des souches

Les souches isolées sont identifiées en basant sur leurs propriétés morphologiques et biochimiques comparés avec des souches de références représentées dans **The Prokaryotes (Dworkin et al., 2006)**. Les propriétés concernées sont : La coloration de Gram, la catalase, l'arginine dihydrolase, le type fermentaire et fermentation des sucres.

6. Conservation des souches isolées

Nos souches sont conservées dans le bouillon MRS à 20% (v/v) de glycérol stérile, le tout sont stockés à température (- 20°C) (Yavuzdurmaz, 2007).

2.3. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques purifiées

2.3.1. Pouvoir acidifiant (Corrieu et Luquet, 2008)

Le métabolisme des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Chaque souche pure a été soumise à ce test.

2.3.1.1. Préparation du lait (Corrieu et Luquet, 2008)

Dans le but de réaliser ce test, on a commencé tout d'abord à préparer le milieu de l'ensemencement selon le protocole suivant :

- ❖ On prépare de lait écrémé à raison de 12g/100ml, puis on le stérilise à 100°C/10minutes et après on laisse refroidir à température ambiante.
- ❖ Par la suite, chaque tube déjà rempli par le lait à raison de 9ml estensemencé par 1ml d'une culture lactique jeune de (18-24h) en bouillon MRS à 37°C. Le tout est incubé à 37°C pendant 24h.

2.3.1.2. Dosage de l'acide lactique (Larpent, 1997)

La détermination de l'acidité d'un lait permet d'apprécier la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques. Le dosage de l'acide lactique par degré dornic correspond à la neutralisation de l'acide par la solution de la soude dornic en présence d'un indicateur coloré c'est la phénolphthaléine (5 gouttes /10ml), 19 flacons de capacité 250ml sont remplis par le lait

écrémé 12% à raison que chaque flacon reçoit 100 ml, chaque un des 19 flacons est ensemencé par le contenu du tube (10ml) puis le tous est incubé à 37°C pendant 24h, après l'incubation, Le dosage d'acidité est fait chaque 3h d'incubation à un intervalle de temps $t_0=0h$, $t_1=3h$, $t_2=6h$, et $t_3=24h$, pour le dosage proprement dit, 20ml du lait est transfère dans un bécher, on divise 20ml sur 2 puis ajouté de 5 gouttes de phénolphtaléine à chaque 10ml de lait (reconstituée à 1% dans l'alcool), cette inoculum est titré avec de la soude dornic jusqu'au virage au rose pâle persistant.

L'acidité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{Na OH}} \cdot 10$$

Où :

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10 ml du lait.

L'acidité globale = la moyenne des acidités élémentaires.

2.3.1.3. Détermination du pH

Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique. La technique consiste à plonger l'électrode du pH mètre dans le volume de lait prélever puis lire la valeur enregistrée sur l'écran après stabilisation de l'afficheur.

2.3.2. Pouvoir protéolytique des bactéries lactiques isolées

Pour la recherche de pour la recherche de l'activité protéolytique des BL sur milieu solide, on a appliqué la méthode des puis dont ils étaient créés sur la gélose YMA déjà coulée et solidifiée puis remplis par les suspensions bactériennes à tester. Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. La présence d'une activité protéolytique est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de chaque disque (Vuilleumard *et al.*, 1986).

2.4. Aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

2.4.1. Pouvoir texturant des bactéries lactiques isolées

Ce test consiste à ensemencer en stries la gélose hypersaccharosée avec les différentes souches bactériennes. Après l'incubation à 37°C /24h, la production de polysaccharides se manifeste par la présence de colonies larges et gluantes (Leveau et Bouix, 1991).

2.4.2. Tolérance aux acides

La tolérance des souches à l'acidité a été réalisée selon la méthode décrite par Pelinescu *et al.*, (2009). Avant de réaliser ce test, les 19 souches bactériennes testées sont cultivées dans le bouillon MRS à 37 °C pendant 6h. Chaque souche a été préparée en triple par culture sur bouillon MRS, 70µl des cultures bactériennes jeunes (de 6h) sont inoculées dans 7ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs du pH (pH2, Ph4 et pH6.5) par du HCl 5M. La croissance bactérienne suivie par la détermination de la densité optique (DO 620 nm) après 6 et 24h d'incubation à 37 °C. La différence de pourcentage entre la variation de la densité optique (DO) à

pH 6.5 ($\Delta DO_{pH6.5}$) et la variation de densité optique (DO) à pH2 ou pH4 (ΔDO_{pH2} ou ΔDO_{pH4}) donne un index de la survit des souches bactérienne qui peut exprimer comme suit (Sieladie et al., 2011):

$$\text{Les cellules vivantes en (\%)} = \frac{\Delta DO_{pH6.5} - \Delta DO_{pH4 \text{ ou } 2}}{\Delta DO_{pH6.5}} \cdot 100$$

2.4.3. Pouvoir antagoniste des souches

Les souches de *Lactobacillus* son ensemencées en stries sur des boites de pétri contenant le MRS les boites sont incubées 48h a 37°C.

- ❖ 40 ml de la gélose MRS sont coulés dans des boites de pétri;
- ❖ Les boites sont séchées sous une hotte à flux laminaire;
- ❖ A l'aide de cure-dents stériles, une colonie de *Lactobacillus* est repiquée en spot (une colonie pour chaque souche)
- ❖ Les boites sont incubées 48 heures à 37°C.
- ❖ Après incubation, chaque colonie est recouverte avec une goutte de milieu GN (gélose nutritive) maintenu en surfusion (50°C). Cela permet de fixer les colonies et d'éviter leur dissension lors de l'étape suivante;
- ❖ Une deuxième couche de milieu GN contenant 40 ml et 2 ml d'une préculture en milieu liquide de 12h d'une souche d'*Escherichia coli* et coulée au dessus de la première couche de la gélose.
- ❖ La lecture des boites s'effectue après 24h d'incubation à 37°C.
- ❖ La taille des zones d'inhibition produite est mesurée (Larpen, 1997).

2.4.4. La Résistance s aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO_{625} varie entre 0.08 et 0.1 puis ensemencée par écouvillonnage sur gélose Muller Hinton déjà coulée et solidifiée. Chaque boite reçoit cinq (5) disques d'antibiotiques à savoir: l'Ampicilline, Erythromycine, Pénicilline G, Streptomycine, Tétracycline. Par convention, la souche est considérée résistante pour un diamètre d'inhibition inférieur à 15 mm et pour un diamètre supérieur ou égale à 15mm la souche est sensible (Idoui et al., 2007).

Résultats et discussions

1. Isolement, purification et identification des bactéries lactiques

A travers cette étude, nous contribuons à la mise en place d'une collection de souches des bactéries lactiques à partir d'une niche écologique de la chèvre, en l'occurrence le rumen. Notre travail a abouti à l'obtention de 19 souches des bactéries lactiques.

1.1. Examen macroscopique

Sur le milieu gélose MRS, il y a apparition des colonies bien isolées, distinctes et de différentes tailles, de couleur blanchâtres brillantes. Après purification, sur chaque boîte, on a remarqué des colonies bien distinctes de même taille et de même couleur témoignant de la pureté des souches.

1.2. Examen microscopique

Après la coloration de Gram, les observations microscopiques montrent que toutes les bactéries retiennent la couleur violette, ce qui semble confirmer qu'on est face d'une collection de bactéries à Gram positif. Ces observations microscopiques ont permis aussi de déterminer la forme et le mode de regroupement : bâtonnets isolés ou disposés en chaînettes.

1.3. Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont résumés dans le tableau 07.

Les résultats ont montré que toute la collection est à catalase négative, ainsi le test de croissance à différentes températures a révélé des souches thermophiles représentées par le genre *Lactobacillus* représentés par *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus frumenti* et *Lactobacillus mucosae* sont capables de pousser à une température de 45°C mais pas à 15°C.

Il est probable que nos souches sont utiles pour les fromages à pâte cuite et yaourts (Alias. 1975). Par ailleurs, la recherche des enzymes ADH, (figure 04), après la période d'incubation 72heures, on a remarqué :

- ❖ Pour l'ADH : l'apparition de couleur jaune (test -) dans le tube 13 ensemencé par la souche R13 ce qui explique l'absence des dihydrolases;
- ❖ Les autres tubes sont colorés en violet (test +) ce qui exprime que les souches correspondantes sont possédantes cette enzymes.

Le test du type fermentaire sur milieu Gibson et Abd-elmalek a montré qu'il y a une souche homofermentaire (figure 05, coté droite) car il n'y a pas de déplacement du bouchon de la gélose blanche (souche : R16). Par contre, les autres souches (R1,.... R15, R17, R18 et R19) sont hétérofermentaires car il y a une fragmentation du milieu associée à un déplacement du milieu et à une production du gaz.

Les résultats de la recherche de type fermentaire sur milieu Gibson et Abd el Malek à montré qu'il y a une souche homofermentaire *Lactobacillus animalis* car il n'y a pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche.

Tandis que les souches restant sont des hétérofermentaire car il y a fragmentation du milieu suite à une production du gaz.

Tableau 07: profils biochimique des souches de bactéries lactiques.

Tests Souches	Gram	Form	Catalase	Croissance à 15°C	Croissance à 44°C	ADH	Type Fermentaire
R1	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R2	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R3	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R4	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R5	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R6	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R7	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R8	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R9	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R10	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R11	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R12	+	B	-	-	+	+/-	Hétéro
R13	+	B	-	-	+	-	Hétéro
R14	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R15	+	B	-	-	+	+/-	Hétéro
R16	+	B	-	-	+	+	Homo
R17	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R18	+	B	-	-	+	+	Hétéro
R19	+	B	-	-	+	+	Hétéro

Homo : homofermentaire B : Bacille
Hétéro : hétérofermentaire - : test négatif + : test positif

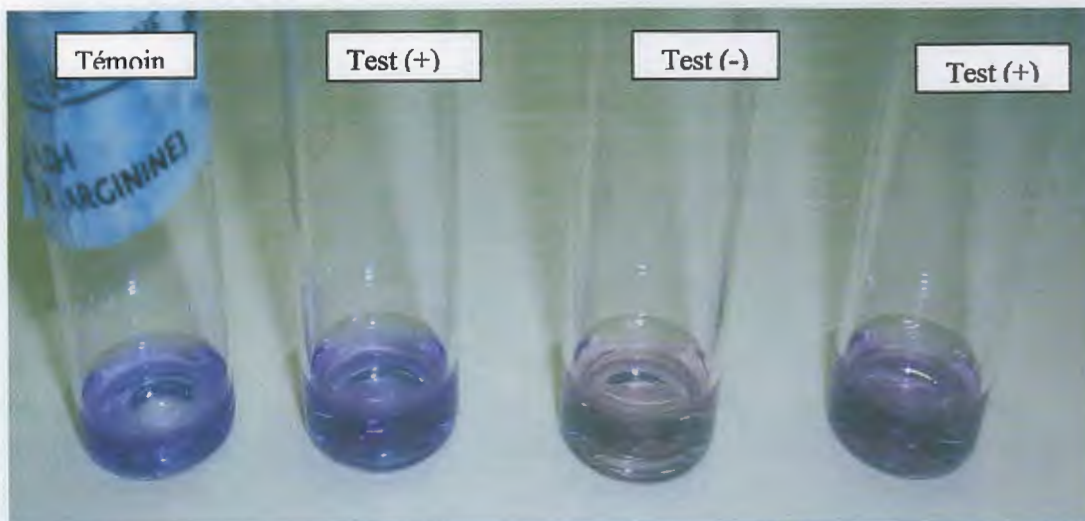


Figure 04: Résultats du test de l'ADH.

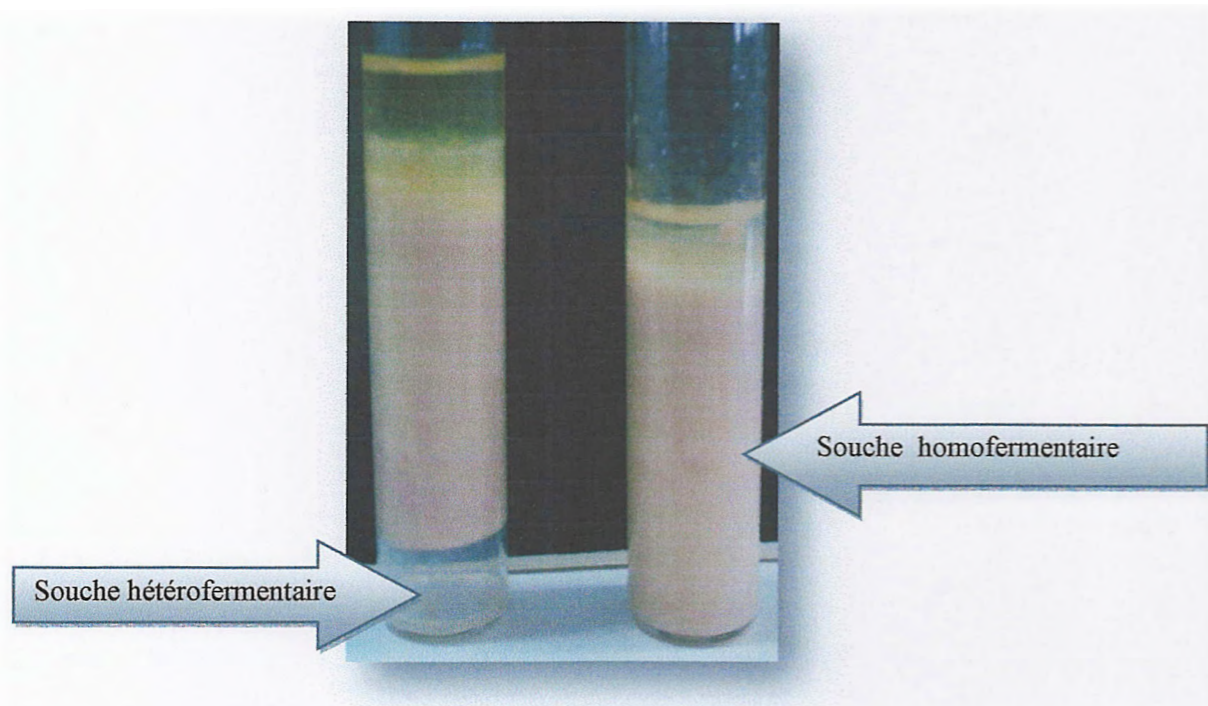


Figure 05: Le type fermentaire sur milieu Gibson et Abd-elmalek.

Tableau 08: profil de fermentation des sucres par les souches isolées.

Souches \ Sucre	Cellobiose	Xylose	Maltose	Tréhalose	Sorbose	Mannose	Salicine	Saccharose	Dulcitol	Dextrine	Raffinose	Adonitol	Inositol
R1	-	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-	-	+	-	-	+
R2	+	+/-	-	+	-	+/-	-	+/-	-	+	-	-	+/-
R3	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
R4	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+	+	-
R5	+/-	+	-	-	+/-	+	-	+	-	-	+/-	-	-
R6	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-
R7	+/-	+	+	-	+	+/-	-	-	-	+	+/-	+	-
R8	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+	-
R9	-	+	+	+	+/-	+/-	+	-	+	+	+	+/-	+
R10	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	+	+	+/-	+	+
R11	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	-	+	+/-
R12	+/-	+/-	-	-		+/-	-	+	+/-	+	+	+	-
R13	+	+/-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+/-
R14	-	-	+	+	+/-	+	+	-	+	+	+/-	-	+
R15	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+	+	+/-
R16	+	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
R17	+	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+	+	+	+	+	+
R18	+/-	+	+	+	+/-	-	-	+	-	+	+	+/-	+/-
R19	+/-	+/-	+	+	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+	+/-	-

1.4. Profil de fermentation des sucres

Les résultats de fermentation des sucres sont illustrés sur le tableau 08. Une souche apte à fermenter le sucre mis au test, conduit à un virage de la couleur du milieu au jaune, celle inapte ne produit pas d'acide à partir de ce substrat et ne provoque aucun changement du milieu, alors que celle ayant un métabolisme long vis-à-vis du substrat donne un changement partiel du milieu de culture (figure 06).

Le métabolisme des sucres va conduire notamment à la production de l'acide lactique et à un fort abaissement du pH, ce qui est recherché pour la fabrication des produits alimentaires. Mais ce processus est avant tout indispensable aux bactéries elles mêmes, leur fournissant de l'énergie (Desmazaud, 1996).

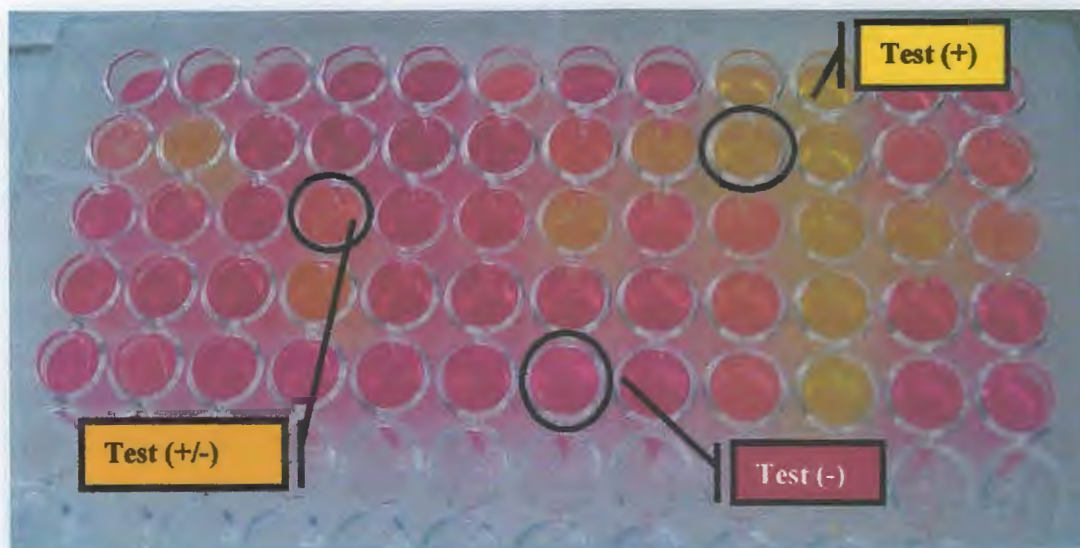


Figure 06: les différents cas résultats des fermentations des sucres.

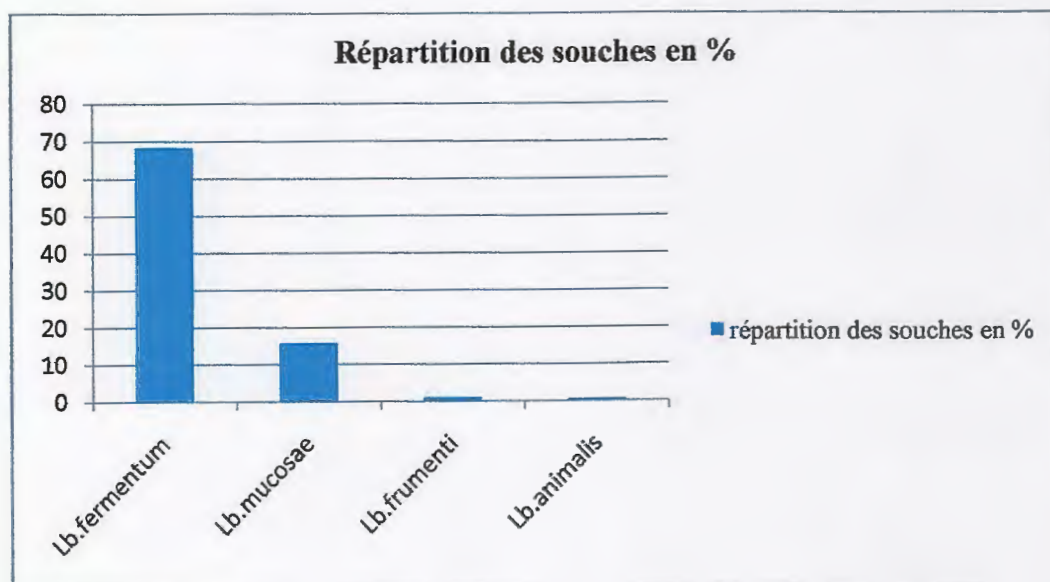
1.5. Identification des souches

La comparaison des résultats des profils de fermentation des sucres et d'autres tests avec ceux représentés dans **the Procaroyotes (Dworkin et al, 2006)** a permis d'identifier les souches en donnant le nom de l'espèce bactérienne correspondante à chaque profil fermentaire. Le **tableau 09** résume la nomenclature des espèces identifiées.

La présence des lactobacilles dans le rumen est décrit par plusieurs auteurs **Briec et al., 2000** ont pu isolé des lactobacilles et des entérocoques hydrolysant l'acide oléique à partir du rumen. ainsi **Yokoyama et al., 1977** peut isoler les lactobacilles à partir du rumen à savoir, *Lb. acidophilus*, *Lb. bifidus* (*Bifidobacterium*), *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. ruminis*, and *Lb. Vitulinus*.

Tableau 09: les noms scientifiques des espèces identifiées.

Code	Espèce identifiée	Code	Espèce identifiée
R1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R11	<i>Lactobacillus fermentum</i>
R2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R12	<i>Lactobacillus fermentum</i>
R3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R13	<i>Lactobacillus fermentum</i>
R4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R14	<i>Lactobacillus frumenti</i>
R5	<i>Lactobacillus mucosae</i>	R15	<i>Lactobacillus frumenti</i>
R6	<i>Lactobacillus mucosae</i>	R16	<i>Lactobacillus animalis</i>
R7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R17	<i>Lactobacillus fermentum</i>
R8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R18	<i>Lactobacillus fermentum</i>
R9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	R19	<i>Lactobacillus mucosae</i>
R10	<i>Lactobacillus fermentum</i>		

**Figure 07:** Répartition des espèces des bactéries lactiques en pourcentage.

2. Etude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques

2.1. Pouvoir acidifiant

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Le processus d'acidification étroitement associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique dan

le milieu de culture, pour cela et pour des objectifs technologique notamment en laiterie, en fromagerie, il est très intéressant de préciser le pouvoir acidifiant des souches lactiques (Corrieu et Luquet, 2008).

La quantité d'acide lactique produite est liée au métabolisme fermentaire : homofermentaire ou hétérofermentaire cela conditionne la nature des acides produits ce qui confirme l'haute acidité chez l'espèce homofermentaire *Lb. animalis* (Leveau et Deroissart, 1991).

Le tableau 10 illustre les résultats de ce test. L'évolution de l'acidité au cours de la croissance des souches identifiées dans le lait écrémé stérile a montré une différence importante et une hétérogénéité dans la production d'acide lactique au sein des souches et en fonction du temps d'incubation. La production de l'acide lactique avec la chute du pH en fonction des souches et du temps est répartie dans les histogrammes représentés dans les figures 08 (a,b), 09(a,b), 10 (a,b) et 11 (a,b). A t_0 (0 heure), la quantité d'acide lactique produite est variée entre 2.5 et 4.2g d'acide lactique par litre du lait. Ainsi et au bout de 24 heures d'incubation, la quantité d'acide lactique produite se situe entre 4.6 et 10.2g/l dont le maximum est produit par l'espèce *Lb. animalis*.

Tableau 10: Résultats de l'activité acidifiante des souches identifiées et ceux du pH.

Temps	$t_0=0$ h		$t_1= 3$ h		$t_2= 6$ h		$t_3= 24$ h	
	pH	°D	pH	°D	pH	°D	Ph	°D
<i>Lb. fermentum</i> R1	6.29	26	6.24	28	6.05	29	5.74	46
<i>Lb. fermentum</i> R2	6.29	25	6.19	25.8	6.10	27.5	5.42	47
<i>Lb. fermentum</i> R3	6.29	27.5	6.24	29.5	6.13	31	5.44	53
<i>Lb. fermentum</i> R4	5.87	33.5	5.75	32.5	5.55	39	4.68	73
<i>Lb. Mucosae</i> R5	6.29	27.5	5.70	31.5	5.50	33	4.98	70
<i>Lb. Mucosae</i> R6	5.98	25	5.72	29.5	5.56	30	4.84	80
<i>Lb. fermentum</i> R7	6.28	33.5	5.79	34	5.78	36	5.21	90
<i>Lb. fermentum</i> R8	6.29	28	5.69	32.9	5.53	37	4.59	84
<i>Lb. fermentum</i> R9	6.17	34.5	5.68	35	5.48	38	4.73	97
<i>Lb. Fermentum</i> R10	6.29	25	5.84	36.5	5.63	38.5	4.62	79
<i>Lb. Fermentum</i> R11	6.25	32	5.50	43	5.34	45	4.69	95
<i>Lb. Fermentum</i> R12	6.29	33	5.49	42.5	5.32	44.5	4.65	72
<i>Lb. frumenti</i> R13	6.27	38	5.44	44	5.28	47	4.66	87
<i>Lb. frumenti</i> R14	6.30	42	5.58	47	5.35	50	4.76	90
<i>Lb. Fermentum</i> R15	6.24	32	5.43	45	5.32	48.5	4.70	98
<i>Lb. animalis</i> R16	6.28	30	5.46	45	5.33	49	4.57	102
<i>Lb. Fermentum</i> R17	6.28	36	5.43	45.5	5.29	49.8	4.60	86
<i>Lb. Fermentum</i> R18	6.29	39	5.52	42	5.31	44	4.75	79
<i>Lb. mucosae</i> R19	6.25	37	5.29	48	5.21	52	4.57	88

°D : degré dornic, h : heure, t : temps

Ces résultats montrent aussi que l'espèce possédant une forte activité acidifiante 10.2g/l est *Lb. animalis* codée R16 suivi de *Lb. fermentum* R15 9.8g/l, *Lb. frumenti* R14 9g/l et *Lb. mucosae* R19 8.8g/l avec une différence au sein des biotypes de la même souche comme chez *Lb.fermentum* codée par R15 où on a remarqué un taux de production de 9.8g/l par rapport à 4.6g/l produit par celle codée R1.

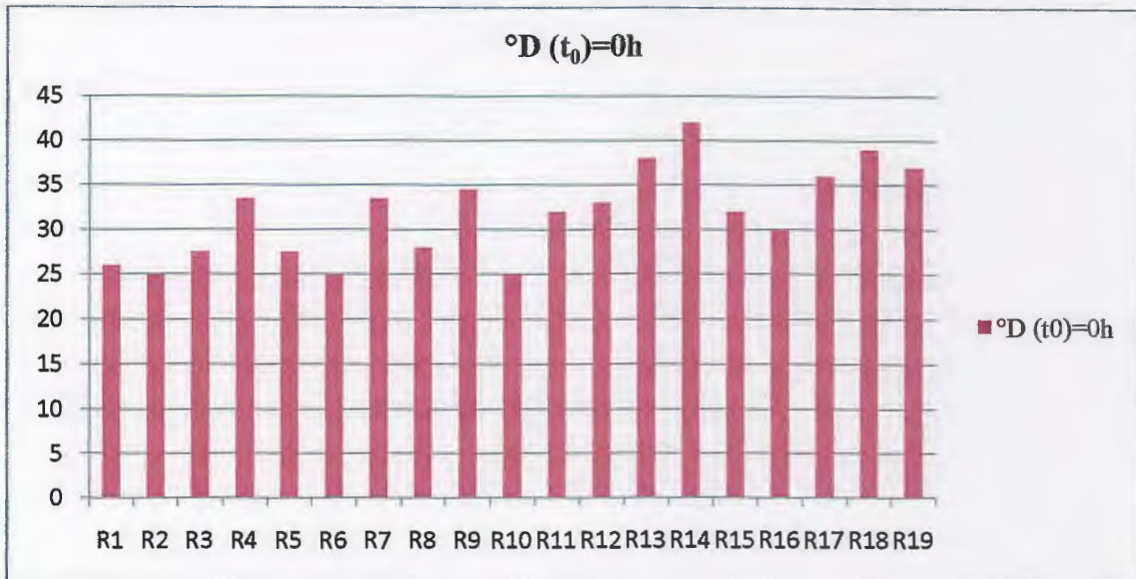


Figure 08 (a): production d'acides lactique à 0 heures.

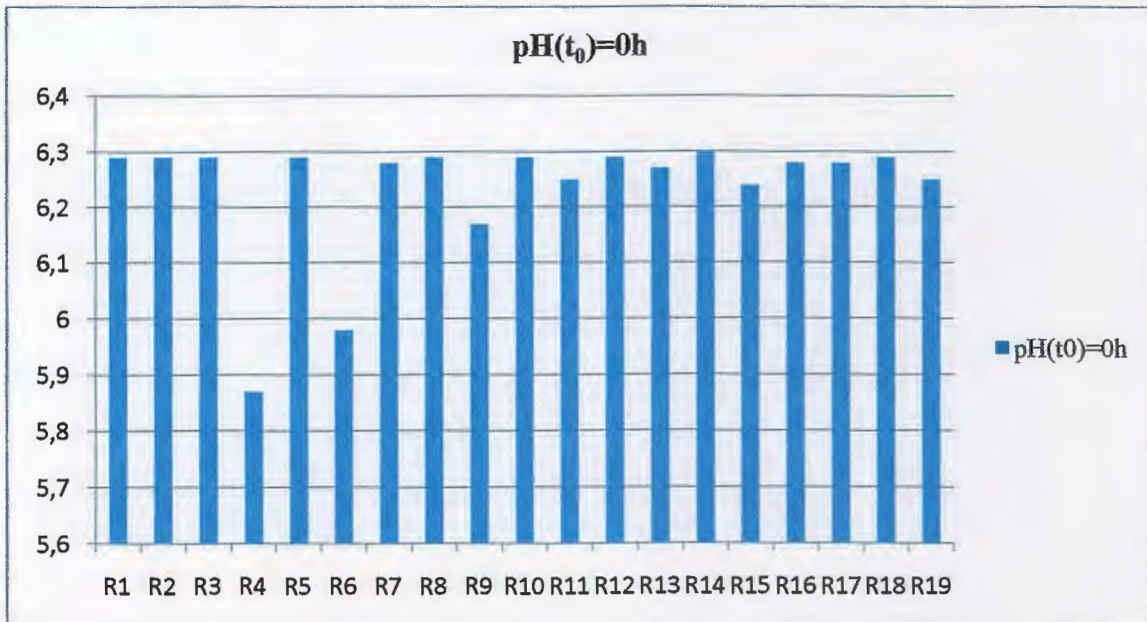


Figure 08 (b) : le pH du lait à t₀=0heures.

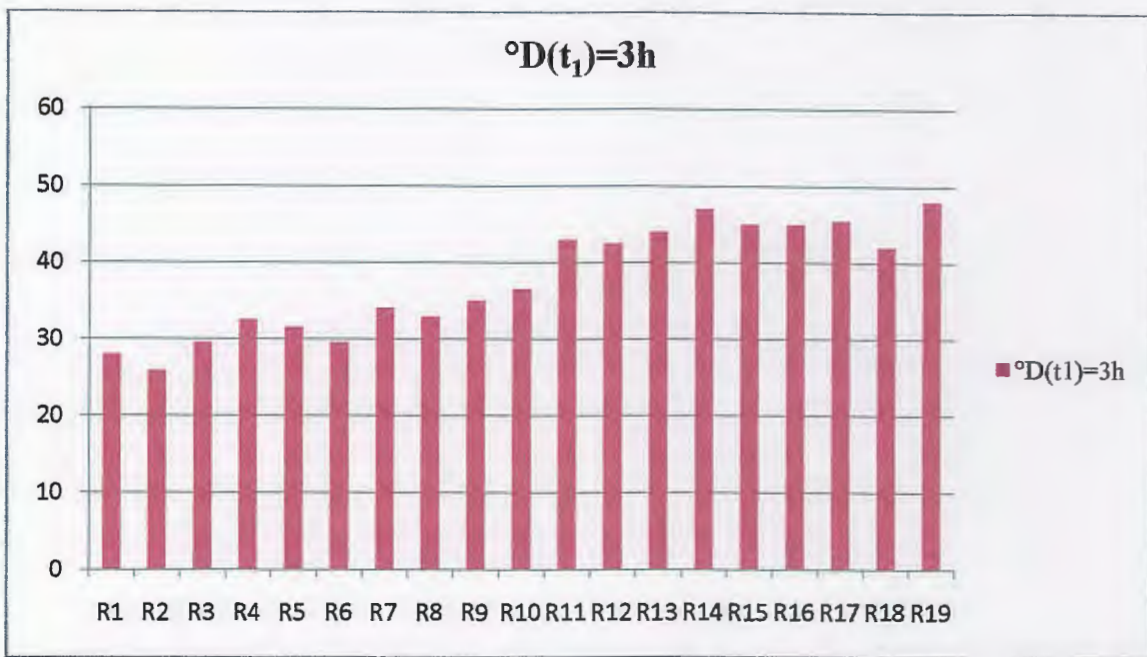


Figure 09 (a) : production d'acide lactique après 3h d'incubation.

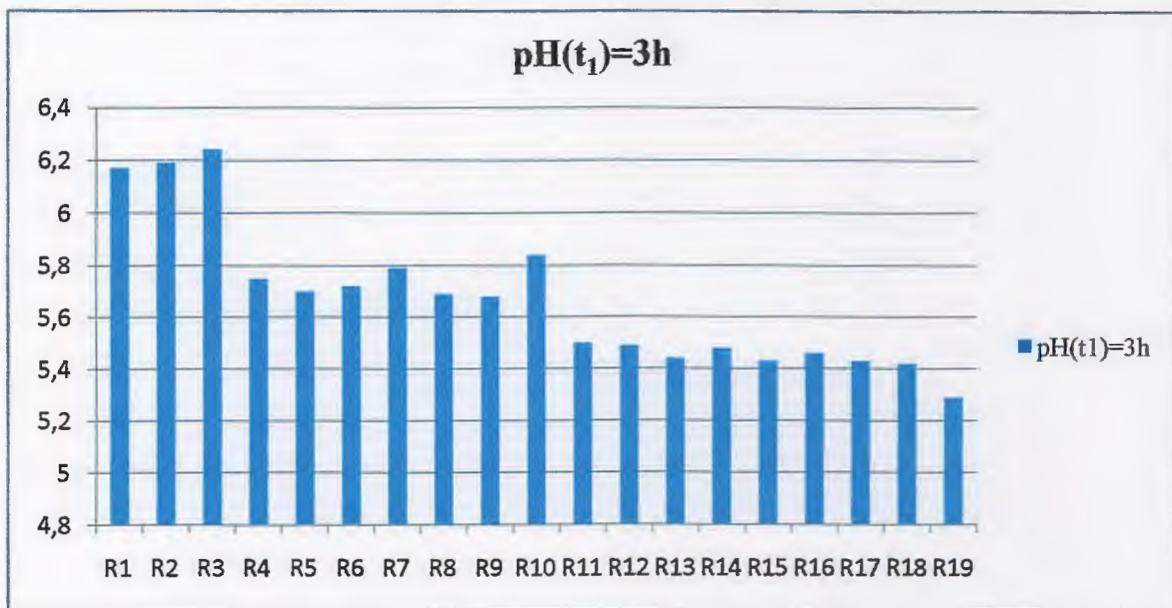


Figure 09 (b) : le pH de lait après 3h d'incubation

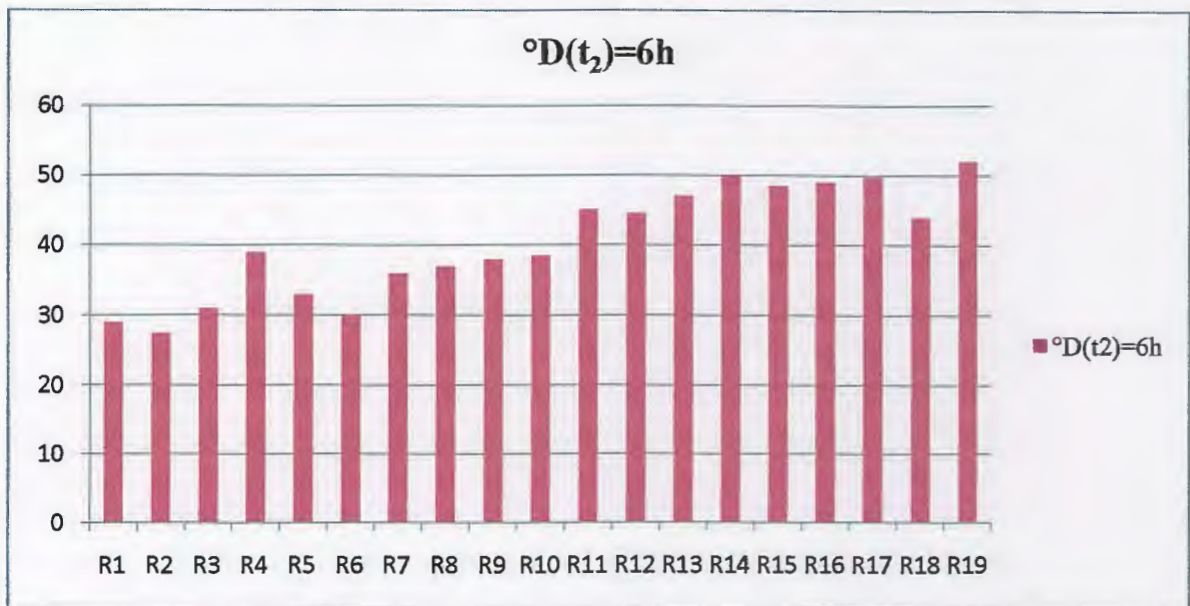


Figure 10 (a) : production d'acide lactique après 6h d'incubation.

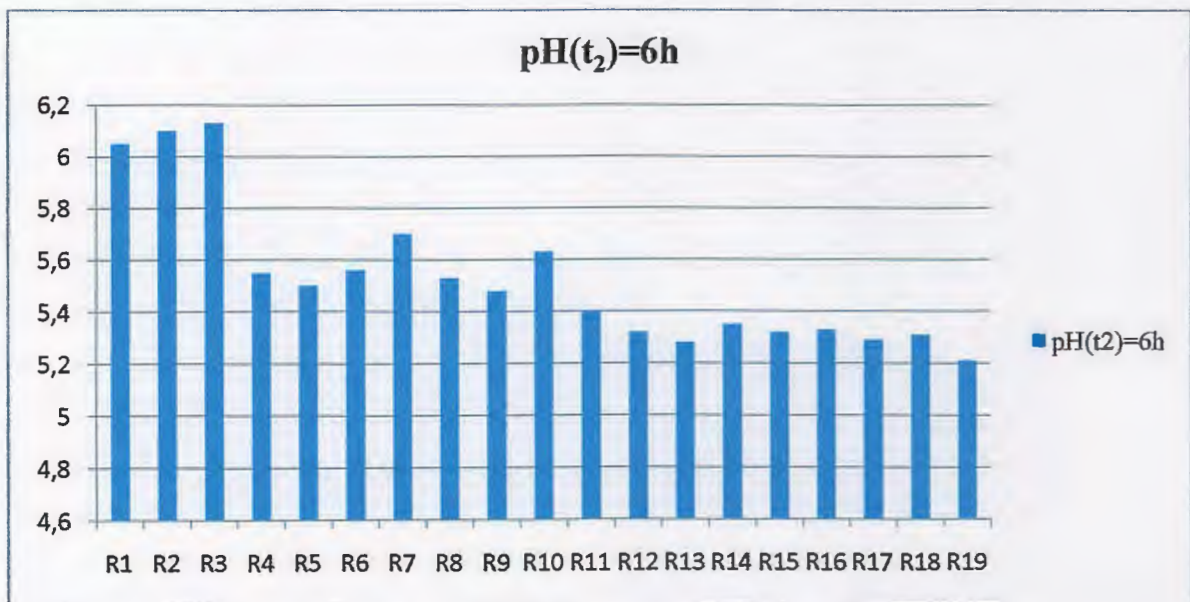


Figure 10 (b) : le pH de lait après 6h d'incubation.

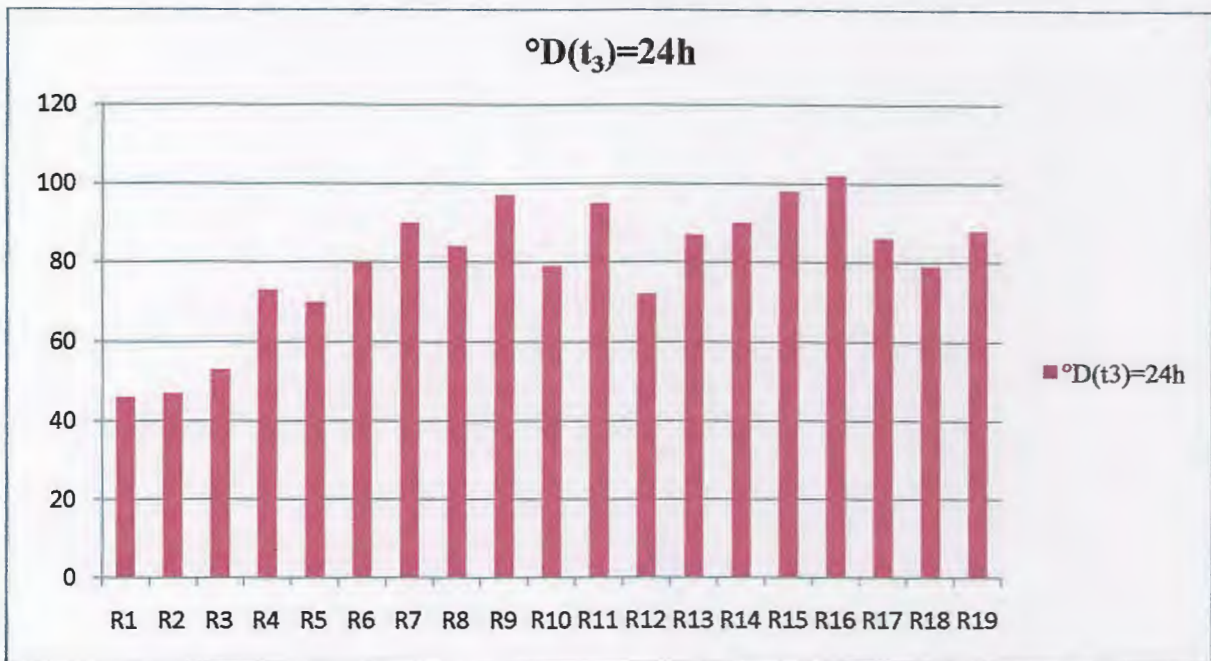


Figure 11 (a) : production d'acide lactique après 24h d'incubation.

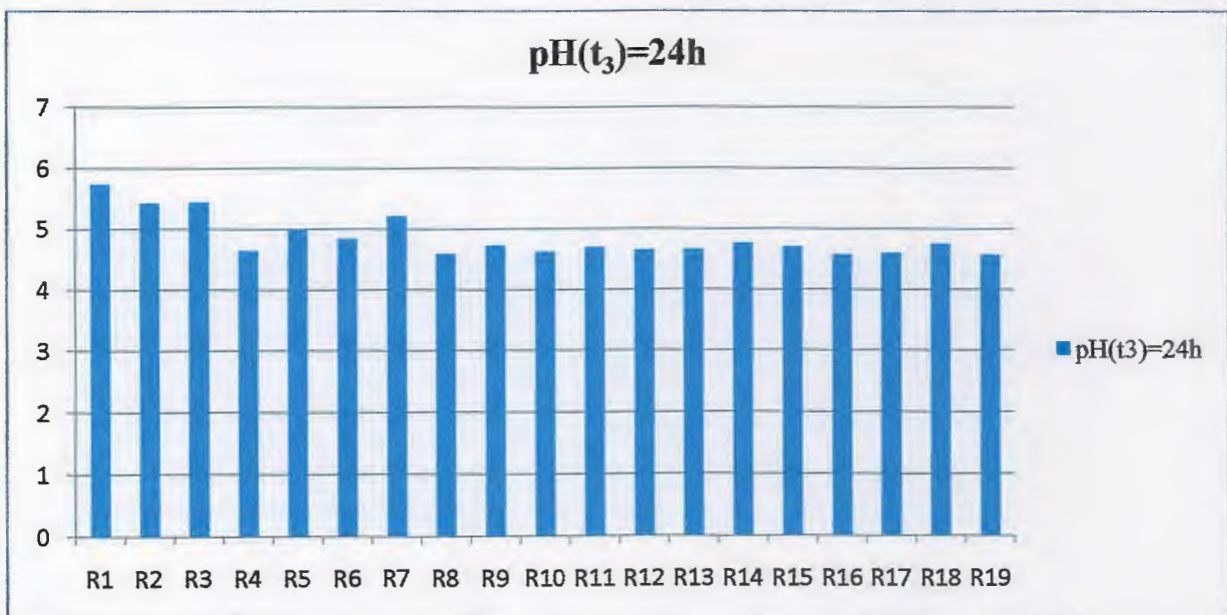


Figure 11 (b): le pH de lait après 24h d'incubation.

Cependant, la même constatation a été enregistrée avec les souches de *Lb. mucosae* codées R5, R6, R19 et *Lb. frumenti* codées R13, R14 où il y a une similarité de leur aptitude acidifiante. La vitesse d'acidification est un critère important en technologie qui vise à sélectionner le plus souvent des souches rapidement acidifiantes « Fast acid producer » (Leveau et Deroissart, 1991).

Ce critère est apparu lors de notre travail où nos souches coagulent le lait en un temps économique, moins de 18 heures précisément commence avant 6 heures. Sauf les souches R1 [t₀=0h 2.6g/l- t₃=24h 4.6g/l], R2 [t₀=0h 2.5g/l- t₃=24h 4.7g/l] et R3 [t₀=0h 2.75g/l- t₃=24h 5.3g/l] ne présentent aucune coagulation du lait associée une faible acidification.

Les résultats obtenus autorisent à dire qu'il existe une relation étroite entre le pH et le degré d'acidité, le pH diminue à mesure que l'acidité augmente.

2.2. Activité protéolytiques

La méthode des puits réalisés au cours de ce test a donné des résultats négatifs puisqu'il n'y a pas des zones de protéolyse autour des puits.

Cette inaptitude à hydrolyser les protéines chez les souches testées est probablement liée à la perte ou l'absence du gène ou plasmides codant pour cette activité car les propriétés technologiques des bactéries lactiques sont portées par des plasmides (Leveau et Bouix, 1991).

Contrairement à nos résultats, Idoui et Karam, 2008 ont montré que des souches de *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc lactis* exercent une activité protéolytique sur le milieu de culture (YMA) avec des zones de protéolyses de diamètre supérieur à 5 mm.

De même, Idoui et al., 2009a ont mis en évidence une activité protéolytique des bactéries lactiques isolées de beurre de brebis.

Souvent l'activité protéolytique extracellulaire des souches lactiques est perdue spontanément dans une souche bactérienne, la perte d'un plasmide serait à l'origine de cette variation chez les cellules protéase-négatives (Prt⁻). Le caractère (Prt⁺) est souvent perdu avec l'activité lactose : il serait porté par les mêmes plasmides chez certaines souches lactiques. Ce plasmide lactose-protéase est alors indispensable pour la croissance de la souche dans le lait (Corrieu et Luquet, 2008).

La protéolyse constitue l'un des phénomènes majeur de l'affinage des fromages. Elle s'agit aussi bien sur la texture de la pâte que sur sa saveur et son arôme (Fox et Law, 1991).

La trame protéique, obtenue après coagulation du lait et égouttage du caillé, surtout si elle est fortement minéralisée, possède un caractère ferme et élastique. Les protéases bactériennes participent à la dégradation partielle de cette trame protéique, ce qui conduit en fin d'affinage, à une texture moins élastique, plus fondante (Desmazaud et al., 1976; Alias 1984).

Les protéases des bactéries lactiques libèrent des oligopeptides et des acides aminés, qui participent à la saveur et à l'arôme des fromages, soit par eux-mêmes, soit par leurs métabolites : acides volatils, alcools... etc. (Mc Sweeney, 1997 ; Urbach, 1997).

Près de la moitié (entre 30 et 50%) du total des bactéries viables isolées du rumen peuvent être protéolytiques. L'activité protéolytique de la flore du rumen, qui est au final très faible en dépit de son importance dans la nutrition, est donc due à l'activité d'un grand nombre d'espèces présentant une activité faible (Wallace et Cotta, 1988).

2.3. Pouvoir texturant

Les résultats de ce test sont portés sur le tableau 11 y, le résultat positif (+) se traduit par l'apparition des colonies larges et gluantes avec aspect brillant sur la gélose hypersaccharosée, en se basant sur cette observation, on a pu remarquer quelques espèces à pouvoir texturant plus ou moins marqué, parmi les souches étudiées il ya :

- ❖ Seulement 06 souches qui n'ont pas la capacité de produire des polysaccharides, ce sont les souches R1, R2, R3, R4, R5, R6 représentent environ 31.57% de la collection des bactéries lactiques isolées.
- ❖ Le reste des souches (de R7 à R19) ont la capacité de produire des polysaccharides, représentent environ 68.43% de la collection des bactéries lactiques isolées en donnant des colonies larges et gluantes et de ce fait elles sont caractérisées d'épaississantes (figure 12).

Tableau 11: production des polysaccharides par les bactéries lactiques.

Souches	Observation	Conclusion
R1	Colonies régulières	Test négatif
R2	Colonies régulières	Test négatif
R3	Colonies régulières	Test négatif
R4	Colonies régulières	Test négatif
R5	Colonies régulières	Test négatif
R6	Colonies régulières	Test négatif
R7	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R8	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R9	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R10	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R11	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R12	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R13	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R14	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R15	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R16	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R17	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R18	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif
R19	Colonies larges gluantes avec aspect brillant	Test positif

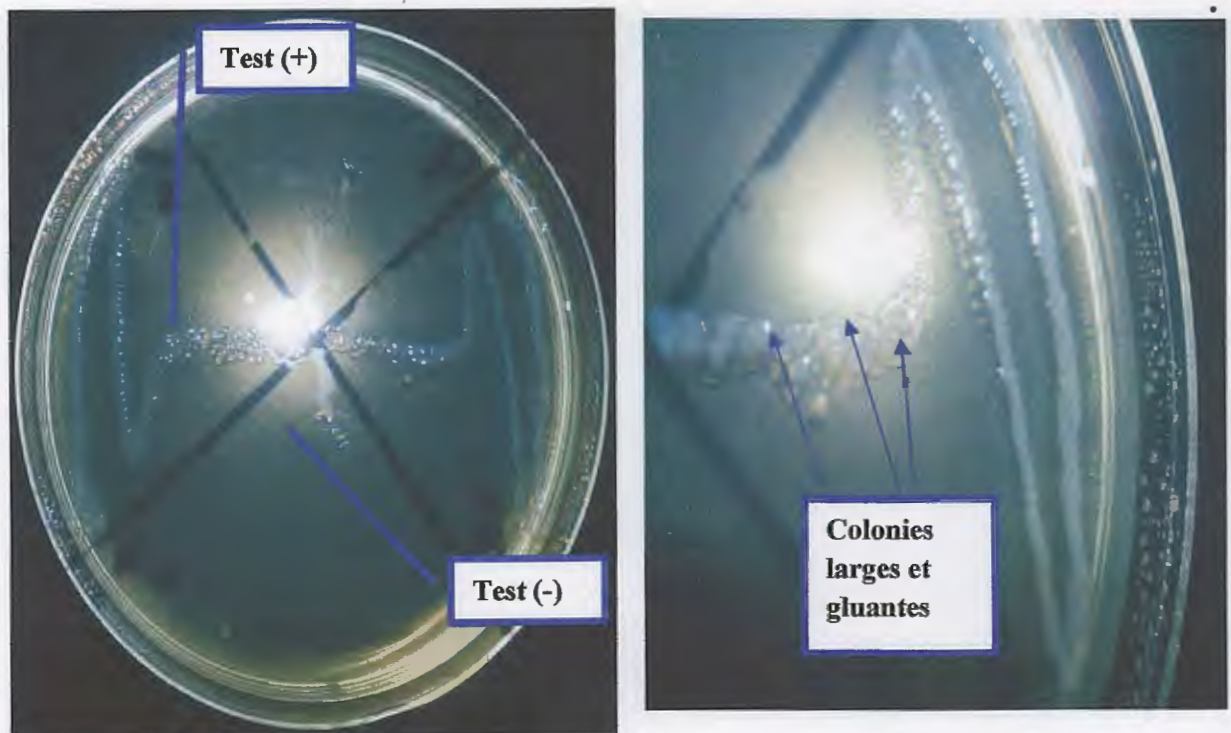


Figure 12: La production des polysaccharides par les bactéries lactiques sur milieu hypersaccharosée.

Les souches présentant cette aptitude sont d'intérêt capital pour certains domaines industriels pour lesquels cette aptitude fait partie des critères de sélection, en revanche, pour d'autres industries, ce type de bactéries n'est pas toléré. La production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques dépende des conditions de croissance et la présence de l'un ou de l'autre des disaccharides : lactose ou saccharose. Cette variation est une propriété chromosomique : elle a lieu en l'absence de plasmides (Corrieu et Luquet, 2008).

Idoui et al., (2009 a) montre que *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ 1187 et deux autres variantes issues de la même souche ont été produit des exopolysaccharides en différents rendements s'elles sont ensemencées dans le lait.

2.4. Tolérance aux acides

Ce test préliminaire à été réalisé pour déterminer le degré de la résistance des bactéries lactiques aux milieux acides. L'étude de l'exposition prolongée de nos souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par leur incubation dans le milieu MRS à différents pH pendant 24h.

Tableau 12 : Les résultats de la DO obtenus, relatifs à la croissance des souches lactiques sur les milieux à pH2, pH 4 comparé à une croissance sur le milieu ordinaire à pH 6.5.

Souches	pH2		pH4		pH6.5	
	DO t = 6h	DO t = 24h	DO t = 6h	DO t = 24h	DO t = 6h	DO t = 24h
<i>L. Fermentum</i> R1	0.020	1.332	0.013	0.028	0.426	2.505
<i>L. fermentum</i> R2	0.018	1.346	0.002	0.037	0.274	2.296
<i>L. fermentum</i> R3	0.024	1.307	0.009	0.040	0.409	1.828
<i>L. fermentum</i> R4	0.236	2.282	0.034	0.017	0.408	1.824
<i>L. Mucosae</i> R5	0.198	2.282	0.039	0.035	0.407	2.437
<i>L. Mucosae</i> R6	0.256	2.303	0.030	0.027	0.374	2.386
<i>L. fermentum</i> R7	0.203	2.282	0.034	0.032	0.434	2.536
<i>L. fermentum</i> R8	0.206	2.242	0.006	0.018	0.537	2.548
<i>L. fermentum</i> R9	0.182	2.242	0.017	0.002	0.411	2.439
<i>L. fermentum</i> R10	0.143	2.224	0.024	0.023	0.399	2.396
<i>L. fermentum</i> R11	0.166	2.282	0.042	0.035	0.401	2.406
<i>L. fermentum</i> R12	0.226	2.282	0.031	0.021	0.267	2.268
<i>L. frumenti</i> R13	0.222	2.224	0.048	0.032	0.417	2.470
<i>L. frumenti</i> R14	0.192	2.261	0.014	0.017	0.389	2.358
<i>L. fermentum</i> R15	0.255	2.282	0.030	0.037	0.417	2.470
<i>L. animalis</i> R16	0.280	2.282	0.027	0.015	0.412	2.448
<i>L. fermentum</i> R17	0.129	2.261	0.026	0.028	0.306	2.309
<i>L. fermentum</i> R18	0.234	2.172	0.030	0.019	0.389	2.381
<i>L. mucosae</i> R19	0.259	2.282	0.028	0.013	0.398	2.406

Le pourcentage de la survie (S %) des souches après 6h et 24h à pH2 et pH4 représenté dans le tableau 13, d'après les résultats obtenus à pH2, les souches codé R1, R2, R3et R17 ayant des pourcentages de la survie (S%) assez important après 6h d'incubation mais elle diminue de 50% après 24h.

Cependant, à pH4 tous les souches représentent un pourcentage de la survie (S%) très important après 6h d'incubation et même après 24h.

Tableau 13 : Le pourcentage de la survie des bactéries lactiques isolées sur milieu à pH 2 et à pH 4.

Souches	pH2		pH4	
	S% après 6h	S% après 24h	S% après 6h	S% après 24h
<i>L. fermentum</i> R1	91.15%	17.85%	94.24%	98.80%
<i>L. fermentum</i> R2	93.43%	38.39%	92.70%	98.30%
<i>L. fermentum</i> R3	88.51%	43.19%	95.69%	98.26%
<i>L. fermentum</i> R4	34.61%	0.65%	68.51%	99.25%
<i>L. mucosae</i> R5	5.26%	0.82%	64.22%	98.47%
<i>L. mucosae</i> R6	13.51%	2.07%	84.69%	98.80%
<i>L. fermentum</i> R7	13.24%	3.91%	85.74%	98.65%
<i>L. fermentum</i> R8	13.08%	5.95%	95.62%	99.24%
<i>L. fermentum</i> R9	12.91%	2.56%	84.40%	99.91%
<i>L. fermentum</i> R10	28.14%	2.02%	87.93%	98.98%
<i>L. fermentum</i> R11	17.41%	0.26%	58.41%	98.81%
<i>L. fermentum</i> R12	15.35%	0.52%	81.43%	99.07%
<i>L. frumenti</i> R13	18.08%	4.38%	77.88%	98.62%
<i>L. frumenti</i> R14	33.56%	0.44%	89.92%	99.25%
<i>L. fermentum</i> R15	5.55%	1.89%	85.50%	98.40%
<i>L. animalis</i> R16	4.10%	1.16%	87.26%	99.35%
<i>L. fermentum</i> R17	53.42%	7.55%	85.31%	98.83%
<i>L. fermentum</i> R18	20.67%	6.13%	89.83%	99.17%
<i>L. mucosae</i> R19	7.82%	0.95%	86.06%	99.42%

Les résultats illustré dans les **figures 13 et 14** montre que le milieu à pH2 affect la survit des souches ; *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus animalis* et certaines souches de *Lactobacillus fermentum* par contre le milieu à pH4 est donne des meilleurs résultats avec toutes les souches.

Le pH du milieu influence fortement la croissance des bactéries lactiques. Les valeurs du pH optimal de croissance sont généralement comprises entre 5.5 et 6 pour les lactobacilles. Des différences peuvent existées entre les souches appartenant à une même espèce (**Corrieu et Luquet, 2008**). D'après (**Sieladie et al., 2011**) les bactéries lactiques sont classées en quatre (4) groupes selon leur résistance au pH2 et pH4 ; les souches de *Lactobacillus fermentum* codé R1, R2 et R3 sont dit très bien parce qu'ils sont capables de survivre dans un milieu à pH2 après 6h mais pas après 24h. Les souches; *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus animalis* et certains souches de *Lactobacillus fermentum* codé R4, R5, R6, R7, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19 sont dit bien parce qu'ils sont capable de survivre dans un milieu à pH4 mais pas à pH2.

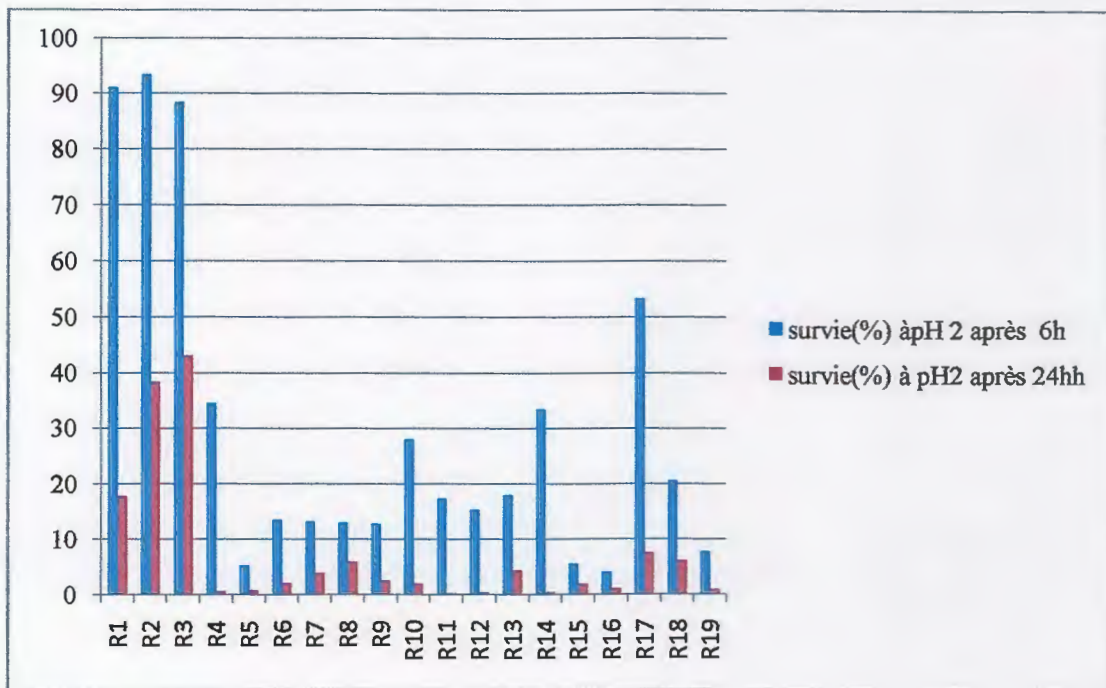


Figure 13 : La survie (%) des souches à pH 2 après 6h et 24h.



Figure 14: La survie (%) des souches à pH 4 après 6h et 24h.

2.5. Pouvoir antagoniste des souches

Ce teste va mettre en évidence les caractéristiques qui possèdent certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autre souches une fois mis en contact. D'après les résultats obtenu sur l'activité antimicrobienne des souches étudiées vis à vis une souche d'*Escherichia coli* on distingue :

L'absence des zones d'inhibition qui s'est traduit par une symbiose qui est le résultat d'une interaction positive qui s'exprime par la stimulation de la croissance des souches mise en contacte vis à vis d'*Escherichia coli*: aucune activité antagoniste envers *E. coli* n'a été révélée. Dans une étude menée par (Ripamonti *et al.*, 2011) ont été montré que l'évaluation de l'activité antagoniste de *Bacillus coagulans* SB 117 par *Lactobacillus animalis* SB 310 révélé l'absence d'une activité antagoniste. Cependant ils observent seulement une très faible inhibition effectuée par *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* SB 137 contre *Bacillus coagulans* SB 117.

2.6. Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme sont groupés dans le **tableau 12**. D'après les résultats obtenus, on conclue que:

- ❖ Tous les souches étudiées sont résistants aux Tétracycline à 30µg;
- ❖ Plus de 70% des souches sont sensibles aux Pénicilline G, Streptomycine et Erythromycine dont le diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm;
- ❖ 78% des souches sont résistants à l'Ampicilline.

Tableau 12: Résultats de l'antibiogramme.

	TE 30µg	P 10 UI	S 500 µg	AM 10µg	E15µg
R1	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)
R2	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)
R3	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)
R4	(R)	(S)	(R)	(S)	(S)
R5	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R6	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R7	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R8	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R9	(R)	(S)	(S)	(S)	(S)
R10	(R)	(S)	(S)	(S)	(S)
R11	(R)	(S)	(S)	(S)	(S)
R12	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R13	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R14	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R15	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R16	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R17	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R18	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
R19	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)
AM 10µg: Ampicilline E 15µg : Erythromycine P10 UI: Pénicilline G S 500µg : Streptomycine TE 30µg : Tétracycline S: sensible R: résistant					

Selon Halimi *et al.*, 2002 ont rapporté que les bactéries lactiques étaient résistantes aux principaux antibiotiques.

Cependant des résultats similaires ont été trouvés par **Ripamonti *et al.*, 2011** ont rapporté que *Lactobacillus animalis* SB310 est sensible au Tétracycline, mais elle résiste au sulphonamides trimetoprim sulphametoxazole trimethoprim.

Les bactéries probiotiques peuvent aider l'hôte à établir une microflore intestinale saine après les perturbations causées par l'administration des antibiotiques (ATB) (**Marteau et Seksik, 2005**). Pour jouer ce rôle, il est important que les probiotiques montrent une résistance aux ATB. Des espèces de *Lactobacillus* ont été évaluées pour la prévention ou le traitement de la diarrhée associée aux ATB (**Boyle *et al.*, 2006**).

La première partie de notre travail avait pour objectif l'isolement et la purification des bactéries lactiques à partir du rumen de chèvre, leur caractérisation au moyen des tests microbiologiques et biochimiques d'identification permettre de mis en place une banque de 19 souches lactiques, cette collection renferme quatre (4) espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* représentés par *L. fermentum*, *L. animalis*, *L. frumenti* et *L. mucosae* dont *L. fermentum* est le plus dominant avec une proportion de 68.42%.

Dans une deuxième partie, on a testé quelques aptitudes technologiques et probiotiques de nos souches à savoir le pouvoir acidifiant, la protéolyse et l'aptitude texturante. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches dépourvues de l'activité protéolytique, pour l'activité texturante elles sont variables où il y a des souches productrices des exopolysaccharides et d'autre non.

Concernant le pouvoir acidifiant on a observé que toutes les espèces ont une bonne acidification avec une production de l'acide lactique, dont la production maximale est 10.2g d'acide lactique par litre du lait observé chez *L. animalis*.

Dans une dernière partie on a étudié les aptitudes probiotiques de nos souches lactiques, le test de croissance en milieu acide montre que nos souches peut résister au certains condition hostiles (pH2, pH4) avec une meilleur résistance de certains souches telle que *L. fermentum* au pH2.

L'étude de la résistance aux antibiotiques à montre globalement que la plupart des souches sont sensibles à ces agents antibactériens.

L'activité antagoniste des souches lactiques contre *E. coli* montre que nos souches n'exerce aucune activité antagoniste contre *E. coli* par contre il y a un symbiose. Enfin, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la majeure partie de nos souches lactiques présente des aptitudes probiotiques selon les testes appliquée.

- Akin D.E. and Benner R., (1988).** Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 1117-1125.
- Al-Dobaib S. N. and Mousa H. M., (2009).** Benefits and risks of growth promoters in animal production. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(2):202-208.
- Alerge I, (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotiques. *Thèse de Doctorat*. Strasbourg. *IPHC*.
- Alias C. (1975).** Science du lait : Principe de techniques laitières. Sepaic, France. 3^{ème} édition : p: 343-375.
- Alias C. (1984).** Science du lait : Principe de techniques laitières. Sepaic, France. 3^{ème} édition : p: 36-68.
- Allison H., Leek D.A., Swenson S. and Reece S., (2007).** Rumen Microbiology and Fermentation. *Animal Nutrition Handbook*, 3: 54-63.
- Amrouche T., (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués, *Thèse de doctorat*, Université Laval, 10,21.
- Badis A., Laouabdia S. N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle", *Sciences & Technologie*, 23, P : 38-45.
- Baliarda A., (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *tetragenococcus* Approches physiologiques et génétiques, *Thèse de doctorat d'état*, L'université Bordeaux, 18.
- Bauchop T., (1981).** The anaerobic fungi in rumen fiber digestion. *Agri. Environ*, 6: 339-348.
- 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*, université de mentouri Constantine, 21-32.
- Bourgeois C.M. et Larpent J.P., (1996).** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Tome 2, 2^{ème} édition, Technique & Documentation, Paris : 16-29.
- Boyle P, Robins-Browne RM et Tang ML., (2006).** Probiotic use in clinical practice: what are risks? *Am J Clin Nut*, 83,1256-64.
- Demeyer D. et Fievez V., (2000).** Ruminants et environnement : la méthanogènes. INRA.EDP science, Annales de Zootechnie, 49 : 95-112.
- De Roissart H.B., (1986).** Bactéries lactiques dans le lait et produits laitiers , Ed ,*Technique & Documentation*. Lavoisier. Paris, 445p.
- De Roissart H. et Luquet F.M., (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol.1, p : 1-286
- Desmazaud M., (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : Utilisation et innocuité. Unité de recherche laitière, Cedex, France. 5 :43-331.

- Desmazeaud M.J, Juge M., (1976).** Caractérisation de l'activité protéolytiques et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Lait*. **555-556**:241-260.
- Doelle H.W., (1969).** Anaerobic respiration In: Bacterial Metabolism. Academic Press, New York and London, 89-127. Citer par **Amokrane S., (2010).** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale, mémoire de magistère, *Université Mentouri Constantine*.
- Doelle H.W., (1969).** Chemosynthesis Anaerobic respiration. In: Bacterial Metabolism. Academic, Press, New York and London, 89-127. Citer par **Amokrane S., (2010).** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale, mémoire de magistère, *Université Mentouri Constantine*.
- 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**(1), 143-154.
- Drouault S. et Corthier G., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé, *Vet. Res.* **32** : 101–117.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. et Stackebrandt E., (2006).** The prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 4: Bacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, *Springer*, p: 357-359.
- Farineau F.K., (2001).** Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Rapport Cordoba, Argentine, 4, 5 et 6.
- Fonty G. et Chaucheyras-Durand F., (2007).** Les écosystèmes digestifs. (Eds), Technique & Documentation, Paris, pp. 79-94 ; 158-187 ; 204-217 ; 252-265.
- Fonty G. et Forano E. (1999).** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polysides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*, **8** (1): 21-35.
- Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet PH.** L'écosystème microbien du reticulo rumen. In : **Jarrige R., Ruckesusch Y., Demarquilly C., Farce M.H. et Journet M., (1994).** Nutrition des Ruminants Domestiques: Ingestion et digestion. (Eds), Paris, France. 299-348. Citer par **Amokrane S., (2010).** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale, mémoire de magistère, *Université Mentouri Constantine*.
- Fonty G., Forano E., Gaudet G., Komisarczuk S. et Gouet PH., (1988 a).** Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques, *Reprod. Nutr. dévelop*, **28**:19-32.
- Fonty G., Grenet E., Fevre M., Breton A. and Gouet PH., (1988 b).** Ecologie et fonctions des champignons anaérobies du rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop*, **1**: 1-18.
- Fox P.F. and Law J., (1991).** Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*, **5** :239-262.
- Givry S., (2006).** Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. *Thèse de doctorat*, Université de Reims Champagne-Ardenne, *UMR FARE 614*, P: 17-23.

- Gouet P.H., Grain J., Dubourguier H.C., Albagnac G., (1986).** Interactions entre espèces microbiennes dans le rumen. *Reprod. Nutr. Develop.*, **26** : 147159.
- Graham L. P. et Malcolm J.L., (1979).** Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *Journal of General Microbiology*, **110**: 21-27.
- Griswoold K. E. et Mackie R.L., (1997).** Degradation of protein and utilization of the hydrolic products by a predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola*. *Journal of Dairy Science*, **80** : 167-175.
- Grenet E., (1997).** Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Prod. Anim*, **10**(3) : 241-249.
- Guillaume H.B., (2007).** Flore du Rumen : Origine, Composition, Evolution, Conséquence Physiopathologiques. *Thèse Medecine Vetrinaire, Alfort*, 21-47.
- Guiraud J.P., (1998),** Microbiologie alimentaire, *Dunod*, Paris, P: 89-92.
- Halami P.M., Chandrashkar A., (2002).** *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Applied Microbiology*. **30**: 197-202.
- Hungate R.E., (1966).** The Rumen and its Microbes. *Academic Press Editor, New York and London*. Citer par **Amokrane S.,(2010).** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale, mémoire de magistère, *Université Mentouri Constantine*.
- Idoui T., Karam N.E. et Leghouchi E., (2007).** Selection of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjunct. *Internationnal Journal of Prebiotics and Probiotics*. **2**(1):144-149.
- Idoui T et Karam N., (2008).** Lactic acid Bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*.**59** (4):361-367.
- Idoui T., Karam N.E. et Leghouchi E., (2009) a.** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*.**60** (2): 177-183.
- Idoui T., Boudjerda Dj., Leghouchi E. et Karam N.E., (2009) b.** Naturally fermented Jijelian black olives: microbiological. *Grasas y Aceites*.**60** (5): 516-520.
- Jarrige R., (1988).** Ingestion et digestion des aliments. In : Alimentation des bovins, ovins et caprins. (Eds), INRA, Paris, p: 29-56.
- Jouany J.P., (1994).** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod , Anim*, **7**(3) : 207-225.
- Jouany J.P. and Ushida K., (1988).** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian. J. Anim. Sci*, **12** : 113-128.
- Kamara D.N., (2005).** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, **89** (1): 124-131.
- Klaenhammer R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**, 337-349.
- Krehbiel, C. R., S. R. Rust, G. Zhang, and S. E. Gilliland., (2003).** Bacterial direct fed microbials in ruminant diets : Performance response and mode of action. *J. Anim Sci.*, **81**: E120-132.

- Klieve A.V., Hudman J.F. and Bauchop T., (1989).** Inductible bacteriophages from ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, **55**: 1630-1634.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **144**, 237-250
- Larpent J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire, *Technique & Documentation, Lavoisier*. Lavoisier, p : 229
- Laurent S., Federighi M. et Jouve J. L., (1998).** Manuel de bactériologies alimentaire, *polytechnica*, Paris, p: 308.
- Leveau J.Y. et Bouix M. (1991).** La flore lactique : Techniques d'analyse et de contrôle dans IAA T3, 2^{ème} édition, *Tech et Doc, Lavoisier*, p : 6-36.
- Leveau J.Y et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industrielle. *Technique & Documentation, Lavoisier*, Paris, P : 171-192.
- Luquet F.M. et Corrieu G., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques, *Technique & Documentation, Lavoisier*, Paris, P: 91.
- Luquet F.M. Et Corrieu G., (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, *Technique & Documentation, Lavoisier*. Paris, P : 667
- Marteau P et Seksik P., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. In: **Luquet F. et Fronsois M.** Probiotiques et alicaments. Paris Lavoisier.
- Marth E.H et Steele J.L., (2001).** Applied Dairy microbiology, 2^{sd} edition. *Marcel Dekker, Inc.* p: 120.
- Mc Sweeny P.L.H.,(1997).** The flavor of milk and dairy products. III. Cheese : *Antonie Van Leeuwenhoek*. **49**: 259-274.
- Morvan B. and Keith N. J., (2000).** Hydration of Oleic Acid by *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sp.* Isolated from the Rumen, *Anaerobie Métabolisme*,**5**, 609.
- Nguyet T., (2008).** Étude de la flore lactique du NEM CHUA, produits carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux 1*.
- Novel G., (1993).** Les bactéries lactiques in : Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Ed *Technique et Documentation, Lavoisier*, p : 614.
- Ouwehand A.C.** The Probiotic Potential of Propionibacteria, *University of Turku, Turku, Finland* in: **Seppo S., Wright A.V. and Ouwehand A., (2004).** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, *Food Science and Technology*. Marcel Dekker, P: 159.
- Poullain F., (1994).** Evolution de la préparation commerciale des ferments lactiques in: Les bactéries lactiques, T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed *Lorica, Lavoisier* p : 604.
- Prescott M., Harley J.P Et Klein D., (2003).** Microbiologie. Bruxelles, Belgique. 2^{ème} édition : *Deboeck*. P : 28-29, 835-837.

- Quillien G., (2001).** Les probiotiques, *Institut National de la Recherche Agronomique*, 2, France, P: 7-10.
- Ripamonti B., Agazzi A., Bersani C., De Dea P., Pecorini C., Pirani S., Rebucci R., Savoini G., Stella S., Stenico A., Tirloni E. and Domeneghini C, (2011).** Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts, *Università degli Studi Milano, Milan, Italy*, 10: 97-105.
- Robin J.M. Et Rouchy A., (2001).** Les probiotiques, *Nutrithérapie Info*.
- Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N., (2009).** Protolysis and autolysis properties of two Lactobacilli isolated from Camel milk of south-Western Algeria. *European Journal of scientific research*, 2: 218-227.
- Saloffe Coste C.J., (1994).** Lactic acid bacteria. Dannone, *News letter n°5 July*.
- Sharpe M.E. (1979).** Identification methods for microbiologists. *Academic Press*. London: 233-259.
- Sieladie D.V., Zambou N.F., Kaktcham P. M., Cresci A. and Fonteh F., (2011).** Probiotics proterties of Lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9: 14-17.
- Sutrat L., Federighi M. et Jouve J.L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire, *polytechnica*, Paris, p: 235- 258.
- Tabak S. et Bensoltane A., (2011).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie*, 06:71- 79.
- Theodorou M.K. et al.** Rumen microorganisms and their interaction. *In : Forbes J.M. and France J. (1993).* Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, *CAB International*, p: 145-163.
- Tokua M., Chagan T., Ushida K. and Kojima I., (1999).** Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microb*, 39 : 123-128.
- Tredez M.L. H., (2008).** Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. *Thèse de doctorat d'état, Université Paul-Sabatier de Toulouse*, 38,39.
- Urbach G., (1997).** The flavor of milk and dairy products. II. Cheese: contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technol.* 50: 79-89.
- Ushida K., Jouany J.P. and Demeyer D.I., (1991).** Effects of presence or absence of rumen protozoa and the effeiciency of utilisation of concentrate and fibrous feeds. *In : Tsuda T., Sasaki y. and Grenet E., 1997.* Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Prod. Anim*, 10(3): 241-249.
- Vuillemard J.C., Amiot J. and Gauthier S., (1986).** Evaluation de l'activité protéolytique des bactéries lactiques par une method de diffusion sur plaque. *Microbiol Alimentation and Nutrition*.3 :327-332.
- Wallace R.J. and Cotta M.A., 1988.** Metabolism of nitrogen containing compound. *In: Hobson P.N.* The rumen microbial ecosystem. *Elsevier Science*, p: 217-249.

Williams A. G. and Withers S.E., 1981. The Production of plant cell wall polysaccharides-degrading enzymes by hemicellulolytic rumen bacterial isolates grown on a range of carbohydrate substrates. *Journal of Applied Bacteriology*, **52**: 377-387.

Yavuzdurmaz H., 2007. Isolation, Characterization, Determination Of Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria From Human Milk, *the Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology*, p:23.

Yokoyama M.T., Carlson J.R. and Holdeman L.V.,(1977). Isolation and characteristics of askatole-producing *Lactobacillus sp.* from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, Dec, p: 837-842.

Composition des milieux de cultures, tampons, réactifs et colorants

Bouillon MRS (gélose MRS)

Peptone	
Extrait de viande	
Glucose	10g
Tween 80	08g
Phosphate bipotassique	20g
Acétate de sodium	1ml
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	5g
Sulfate de manganèse	2g
Eau distillée qsp	0.2g
pH 6.2. Autoclavage a 120°C pendant 15 min.	0.05g
	1000ml

Gélose YMA pH 7.2

Extrait de levure	
Peptone	
Lait écrémé	3g
Agar	5g
Eau distillée qsp	1g
	15g
	1000ml

Gélose Gibson et Abd-elmalek pH 6.5

Extrait de levure	
Glucose	
Jus de tomate à pH 6.5	2.5g
Lait (9%)	50g
Gélose nutritive	100ml
Ajuster le pH à 7, repartir en tubes, stériliser	800ml
en vapeur fluente pendant 3 jours consécutifs	200ml
et solidifier en position vertical.	

Gélose hypersaccharosée pH 6.8

Extrait de viande	
Extrait de levure	
Bacto-peptone	10g
Phosphate dipotassique	3g
Saccharose	2.5g
NaCl	2g
Sulfate de magnésium	150g
Agar	1g
Eau distillée	0.2g
	15g
	1000ml
Stérilisation 20 min à 120°C.	

Soude dornique (N/9)

Soude pure

Eau distillée

4.4g

Lait écrémé stérile à 12%

100ml

Lait écrémé en poudre

Eau distillée

12g

Violet de Gentiane

100ml

Violet de Gentiane

Éthanol à 90%

Phénol

1g

Eau distillée

10ml

2g

Fushine de Ziehel

100ml

Fuschine basique

Alcool éthylique à 90%

Phénol

1g

Eau distillée

10g

5g

Lugol

1000ml

Iode

Iodure

Eau distillée

1g

2g

300ml

Présenté par : BOUHALLAS Chafia DROUCHE Wahiba	Encadré par : Mr KHENNOUF T.	Soutenu Le 02. 07. 2012
---	--	-----------------------------------

La microflore lactique du rumen: screening des souches potentiellement probiotiques.

Résumé

Dix-neuf souches sont isolées à partir de rumen du chèvre de la région de Djimla, afin de sélectionner des souches potentiellement probiotiques, leur identification nous a permis d'obtenir quatre (4) espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* représentés par *L. mucosae*, *L. fermentum*, *L. animalis* et *L. frumenti*. Leur identification au moyen des tests microbiologiques et biochimiques ainsi l'étude de quelques aptitudes technologiques et probiotiques ont permis de distinguer un pouvoir acidifiant assez important atteint 10.2g/l d'acide lactique observé chez *L. animalis* qui est le seul isolat homofermentaire, environ 68.43% de la collection des bactéries lactiques isolées ont la capacité de produire des exopolysaccharides, par contre l'activité protéolytique est absente chez tout les espèces identifiées. Pour confirmer leur potentiel probiotique, des tests complémentaires ont été réalisés leur profil de résistance aux antibiotiques qui donne des souches sensibles et d'autre résistantes, toutes les souches sont résistantes à l'acidité (pH 4) et quelques souches résistent même le pH 2.

Mots clés : bactéries lactiques, probiotiques, rumen.

Abstract

In order to select a potentially probiotics strains of lactic acid bacteria, nineteen strains were isolated from rumen of goats from the region of Djimla their identification has allowed us to obtain four (4) species of the genus *Lactobacillus* *L. L. mucosae*, *L. fermentum*, *L. animalis* and *L. Frumenti*. The study of some probiotic and technological properties show that these strains have a high acidifying power (10.2g/l produced by *L. Animalis* which is homofermentative strain). 68.43% for the strains produce exopolysaccharides and there are no proteolytic and antimicrobial activities. Regarding to the resistance of acid all strain are resistant in pH 4 and some strain resist even in pH 2. All strains resist to tetracyclin and ampicilline antibiotics and there is no resistance with others.

Key words : acid lactic bacteria, probiotic, rumen.

ملخص

إن التأثير الإيجابي للبكتيريا البنية معروف منذ مدة طويلة, هذا التأثير يظهر جليا في تثبيط البكتيريا الضارة من التكاثر, كذلك لها فعل إيجابي على بعض الأمراض الأخرى مثل تقليل نسبة الكلسترول في الدم, لها فعل مضاد لبعض السرطانات... الخ. قمنا بعزل بكتيريا لبنية من كرش (المعدة الأولى للمجترات) ذكر الماعز من منطقة جيملة و هذا من أجل البحث عن سلالات بكتيرية ذات تأثير إيجابي او (بروبيوتيك), الدراسة أجريت على 19 سلالة تحصلنا على 4 أنواع هي: *Lb. frumrnti*, *Lb. Frmentum*, *Lb. Mucosae*, *Lb animalis*.

كرس هذا العمل من أجل البحث عن البكتيريا اللبنية ذات الأداء البروبيوتكي و هذا من خلال دراسة كفاءتها التكنولوجية و البروبيوتكية حيث تمت دراسة كمية حمض اللبن المنتجة (*L. animalis* هي الأكثر إنتاجا), إنتاج متعددات السكر الخارجية الذي وجد عند بعض الأصناف دون الأخرى بينما يغيب النشاط الإنزيمي الهادم للبروتينات. من أجل إثبات مميزات البروبيوتكية, أجريت المزيد من الاختبارات مثل مدى مقاومتها للمضادات الحيوية و أيضا مدى مقاومة السلالات للحموضة المنخفضة (pH4, pH 2) وأظهرت النتائج أن أغلب السلالات حساسة للمضادات الحيوية بينما كل السلالات مقاومة للحموضة (pH4).

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية, بروبيوتيك, كرش (المعدة الأولى للمجترات).

