

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Témouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Biologie
Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

Contribution à l'étude des souches de bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache

Soutenu le : 28 / 06 / 2026.

Présenté Par :

- 1) M^{elle} Benzzina Halima Nour El Houda
- 2) M^{elle} Ben Mahammed Fatima Zahra
- 3) M^{elle} Benrezzag Karima

Devant le jury composé de :

Dr. BENHABIB Ouassila	MCA	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Président
Dr. LACHACHI Meriem	MCA	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Examineur
Pr. BELLAHCENE Miloud	Professeur	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2025/2026

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Avant de commencer la présentation de ce travail, nous profitons de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'examiner ce mémoire et de l'enrichir par leurs suggestions.

*Nous remercions tous particulièrement notre encadrant **M. BELLAHCENE Miloud**. Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre confiance, votre gentillesse, votre patience méritent toute admiration. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer notre respect et notre reconnaissance.*

*Nos remerciements les plus respectueux vont à **Mme BENHABIB Ouassila** qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury. Veuillez trouver ici Madame le témoignage de notre reconnaissance et notre respect le plus profond.*

*Nous remercions également **Mme LACHACHI Meriem** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail et de siéger parmi ce jury. Veuillez accepter ce travail, en preuve de notre grand respect et de toutes nos profondes reconnaissances.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont enseigné et qui ont contribué à notre formation.

N'oublions pas de remercier nos très chers parents, frères et sœurs, nos collègues et amis pour leur contribution, leur soutien, leurs encouragements et leur patience.

A toutes et tous, un grand merci !

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

À moi-même,

Pour tous les efforts, la patience et la persévérance dont j'ai fait preuve tout au long de ce parcours. Je suis fière d'avoir atteint cet objectif après plusieurs années de travail.

À mes très chers parents,

Ma mère "Khadidja" et mon père "Mohamed», qui ont toujours été à mes côtés, m'ont soutenue, encouragée et offert tout ce dont j'avais besoin pour réussir. Votre amour, vos sacrifices et votre confiance ont été ma plus grande force. Je vous aime infiniment.

À mes frères et mes sœurs,

Amin et Kouider, Choumissa et Fatima, merci pour votre soutien, vos encouragements et votre présence dans les moments difficiles comme dans les moments de joie.

À mes adorables nièce et neveux,

Kamar, Khadidja, Kawther, Aymen et Haïthem, qui apportent tant de bonheur et de joie à notre famille.

À mes très chères amies,

Khadidja, Faïza, Fatima et Hanane, qui sont pour moi bien plus que des amies, de véritables sœurs. Merci pour votre soutien, votre écoute et tous les beaux moments partagés ensemble.

À mes chères collègues de mémoire,

Karima et Houda, qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure. Merci pour votre aide, votre encouragement et votre présence jusqu'aux dernières étapes de ce travail.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Fatima

Dédicace

Avant toute chose, je remercie Allah, le Tout-Puissant, pour Sa grâce infinie, pour la force qu'il m'a accordée dans les moments de faiblesse, pour la patience qu'Il m'a donnée face aux difficultés, et pour la lumière qui a guidé chacun de mes pas jusqu'à l'achèvement de ce travail.

Je dédie ce travail

À moi-même,

Pour toutes les fois où j'ai choisi d'avancer malgré la fatigue, de croire malgré les doutes et de persévérer malgré les difficultés. Ce travail témoigne d'un parcours rempli d'efforts, de sacrifices et d'espoir. Je me le dédie avec fierté, comme la preuve que la volonté et la persévérance finissent toujours par porter leurs fruits.

À mes très chers parents,

À vous qui avez toujours cru en moi, votre amour, vos sacrifices et votre soutien ont été ma force et ma lumière. Ce travail est le fruit de votre dévouement et vous est dédié avec toute ma gratitude, mon respect et mon amour.

À mes chères sœurs et à mon cher frère,

Pour votre amour, votre soutien et votre présence tout au long de mon parcours, vous avez été ma force et ma motivation. Recevez ce travail avec toute ma gratitude et mon affection

À mes beaux-frères,

Pour votre soutien, votre encouragement et votre présence tout au long de mon parcours. Avec toute ma reconnaissance et mon estime.

À mes collègues de mémoire,

Fatima et Houda, merci pour votre entraide, votre esprit d'équipe et votre soutien tout au long de ce travail. Travailler à vos côtés a été une expérience enrichissante, faite de partage et de collaboration.

Ce travail est le fruit d'années d'efforts et de persévérance. Je remercie sincèrement toutes les personnes qui m'ont soutenue, de près ou de loin, et leur exprime toute ma gratitude.

Karima

Dédicace

J'ai l'honneur et le grand plaisir de dédier ce travail :

À moi-même, à la persévérance que j'ai su préserver, à la discipline que j'ai cultivée et aux efforts que j'ai choisi de ne jamais abandonner. Aux jours de doute où j'ai continué malgré tout, et aux moments difficiles que j'ai transformés en force et en maturité. Ce travail est le reflet de mon engagement, de mon évolution et de la confiance que j'ai appris à construire. Je me le dédie avec gratitude, fierté et respect

À mon très cher père, en témoignage de ma profonde reconnaissance. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime et le respect que je vous porte. Vos efforts, vos sacrifices et votre soutien constant ont été essentiels à ma réussite et à mon éducation.

À ma très chère mère, source infinie d'amour et de tendresse. Votre présence, votre patience et vos prières ont été mon refuge et ma force dans les moments difficiles. Je vous dois tout mon respect et toute ma gratitude.

À mes chères sœurs (Marwa, Fadoua, Mouna, Soltana, Khalida, Naima et Firdaous), pour leur affection, leurs encouragements et leur soutien moral tout au long de mon parcours.

À mes frères (Ahmed, Youcef et Mahdi), pour leur présence, leur aide et leur encouragements qui m'ont toujours apporté du réconfort.

À ma chère grand-mère Mima et à mon cher grand-père, pour leur amour, leurs prières et leur soutien inconditionnel. Que Dieu leur accorde santé et longue vie.

À la mémoire de mes chers grands-parents, que Dieu leur accorde Sa miséricorde et les accueille dans Son vaste paradis. Leur souvenir restera à jamais gravé dans mon cœur.

À ma meilleure amie Milouda, pour sa fidélité, son écoute et son soutien sincère dans les moments importants de ma vie.

À mes chères collègues Fatima et Karima, pour leur esprit d'équipe, leur collaboration et leur partage tout au long de ce travail. Ce fut une belle expérience humaine et académique. Ce travail est le fruit de tous vos soutiens et de ma volonté d'aller jusqu'au bout

Houda

Résumé

Après isolement et purification, les isolats obtenus ont été soumis à divers tests d'identification suivi de quelques tests physiologiques, tels que la coloration de Gram, le test de la catalase, le test de l'oxydase, la croissance à différentes températures, à divers pH, à différentes concentrations de NaCl, le type fermentaire, la thermorésistance, et le test de la croissance sur milieu à base de lait de Sherman. Ce travail est achevé par une étude sur l'activité antagoniste des isolats vis-à-vis de trois germes pathogènes et enfin, un test de sensibilité aux antibiotiques. Les résultats obtenus ont révélé la présence de bactéries lactiques à coloration Gram positive et catalase négative, démontrant une bonne adaptation à diverses conditions de croissance ainsi qu'une activité inhibitrice non négligeable contre certains microorganismes pathogènes. Cette étude confirme ainsi l'intérêt du lait cru de vache en tant que source de bactéries lactiques pouvant être exploitées dans les domaines agroalimentaire et biotechnologique.

A la lumière de ces résultats, les cinq isolats lactiques se sont répartis en deux groupes, trois de forme Cocci et deux de forme bacilles. Tous se sont révélés Gram-positifs, catalase-négatifs et homo-fermentaires. Sur le plan physiologique, tous les isolats tolèrent des températures de 37°C et 45°C, une concentration de 4% de Na Cl et un pH de 9,6. A l'inverse un seul isolat s'est développé à 6,5% de Na Cl et seulement deux isolats se sont montrés thermorésistants (croissance à 63°C). En revanche, aucun isolat ne s'est développé à pH 4,5. Les résultats de l'antibiogramme ont montré que certains isolats se sont révélés sensibles alors que d'autres se sont montrés résistants. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré que certains isolats lactiques possèdent un pouvoir inhibiteur non négligeable contre *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : Lait de vache, analyses microbiologiques, isolats lactiques, antibiogramme, activité antimicrobien, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Abstract

After isolation and purification, the obtained isolates were subjected to several identification and physiological tests, including Gram staining, catalase and oxidase tests, growth at different temperatures, pH values and NaCl concentrations, fermentation type, heat resistance, and growth on Sherman milk medium. The study was completed by evaluating the antagonistic activity of the isolates against three pathogenic microorganisms and by performing an antibiotic susceptibility test.

The results revealed the presence of Gram-positive, catalase-negative lactic acid bacteria that showed good adaptation to various growth conditions and significant inhibitory activity against certain pathogens. The five isolates were classified into two groups: three cocci and two bacilli. All isolates were homofermentative and tolerated temperatures of 37°C and 45°C, 4% NaCl, and pH 9.6. Only one isolate grew at 6.5% NaCl, while two isolates were thermoresistant at 63°C. No isolate grew at pH 4.5. Antimicrobial tests showed that some isolates exhibited inhibitory activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. This study confirms that raw cow's milk is a valuable source of lactic acid bacteria with potential applications in the food and biotechnology industries.

Keywords: Raw cow's milk, microbiological analysis, lactic acid bacteria isolates, antibiogram, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

الملخص

بعد عزل وتنقية السلالات البكتيرية، أُخضعت لعدة اختبارات تعريفية وفسيولوجية، شملت تلوين غرام، واختباري الكاتالاز والأوكسيداز، والنمو عند درجات حرارة مختلفة، وقيم مختلفة للأسم الهيدروجيني، وتراكيز متفاوتة من كلوريد الصوديوم، وغط التخمر، والمقاومة الحرارية، واختبار النمو على وسط حليب شيرمان. كما تم تقييم النشاط التثبيطي لهذه العزلات ضد ثلاثة كائنات ممرضة وإجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية.

أظهرت النتائج وجود بكتيريا حمض اللاكتيك موجبة الغرام وسالبة الكاتالاز، مع قدرة جيدة على التأقلم مع ظروف نمو مختلفة ونشاط تثبيطي ملحوظ ضد بعض الكائنات الممرضة. وتم تصنيف العزلات الخمس إلى مجموعتين: ثلاث عزلات كروية الشكل وعزلتان عصويتان. كما تبين أن جميع العزلات متجانسة التخمر وقادرة على النمو عند درجتي حرارة 37 و 45 درجة مئوية، وفي وسط يحتوي على 4% من كلوريد الصوديوم، وعند قيمة pH تساوي 9.6. في المقابل، نمت عزلة واحدة فقط عند تركيز 6.5% من كلوريد الصوديوم، بينما أظهرت عزلتان مقاومة حرارية وقدرة على النمو عند 63 درجة مئوية، ولم تُظهر أي عزلة نموًا عند pH 4,5. كما بينت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية أن بعض العزلات كانت حساسة، في حين أظهرت عزلات أخرى مقاومةً لبعض المضادات الحيوية المختبرة. كذلك، أظهرت اختبارات النشاط المضاد للميكروبات قدرة بعض العزلات على تثبيط نمو كلٍّ من *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans*.

تؤكد هذه الدراسة أهمية حليب البقر الخام بوصفه مصدرًا غنيًا ببكتيريا حمض اللاكتيك، التي يمكن استغلالها في الصناعات الغذائية والتطبيقات البيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: حليب البقر الخام، التحاليل الميكروبيولوجية، عزلات بكتيريا حمض اللاكتيك، اختبار الحساسية للمضادات الحيوية، النشاط المضاد للميكروبات، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Candida albicans*.

Table des matières

<i>Résumé.....</i>	<i>A</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>I</i>
<i>Liste des tableaux.....</i>	<i>III</i>
<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>IV</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Revue Bibliographique</i>	<i>4</i>
<i>I. GENERALITE SUR LE LAIT.....</i>	<i>5</i>
<i>I.1 Le lait.....</i>	<i>5</i>
<i>I.2 Composition biochimique de lait</i>	<i>5</i>
<i>I.2.1Composition d'un litre de lait</i>	<i>6</i>
<i>I.3 Propriétés physico-chimiques du lait</i>	<i>7</i>
<i>I.3.1 Densité.....</i>	<i>7</i>
<i>I.3.2 Acidité.....</i>	<i>7</i>
<i>I.3.3 pH</i>	<i>7</i>
<i>I.3.4 Point de congélation et point d'ébullition</i>	<i>7</i>
<i>I.4 Flore microbienne du lait</i>	<i>7</i>
<i>I.4.1 Flore indigène (originelle = constante).....</i>	<i>8</i>
<i>I.4.2 Flore accidentelle</i>	<i>9</i>
<i>I.4.2.1 Flore d'altération</i>	<i>9</i>
<i>I.4.2.2 Flore pathogène</i>	<i>10</i>
<i>II. GENERALITE SUR LES BACTERIES LACTIQUES.....</i>	<i>11</i>
<i>II.1 Historique</i>	<i>11</i>
<i>II.2 Définition et caractères généraux</i>	<i>11</i>
<i>II.3 Habitat des bactéries lactiques</i>	<i>12</i>
<i>II.4. Taxonomie des bactéries lactiques</i>	<i>12</i>
<i>II.5. Principaux genres de bactéries lactiques</i>	<i>13</i>
<i>II.5.2 Genre <i>Lactococcus</i></i>	<i>14</i>
<i>II.5.3 Genre <i>Leuconostoc</i></i>	<i>14</i>
<i>II.5.4 Genre <i>Streptococcus</i></i>	<i>15</i>
<i>II.5.5 Genre <i>Enterococcus</i></i>	<i>16</i>
<i>II.6 Voies métaboliques</i>	<i>17</i>
<i>II.6.1 Homofermentaire</i>	<i>17</i>
<i>II.6.2 Hétérofermentaire</i>	<i>17</i>
<i>II.6.3 Voie bifide</i>	<i>18</i>
<i>II.7 Identification des bactéries lactiques</i>	<i>18</i>

II.7.1 Identification phénotypique	19
II.7.1.1 Examen macroscopique	19
II.7.1.2 Examen microscopique	19
II.7.1.3 Recherche de la production de gaz (type fermentaire)	19
II.7.1.4 Identification par galerie API50	20
II.7.2 Identification génotypique	20
II.7.3 Action de la flore du lait	20
II.8 Propriété antimicrobienne des bactéries lactiques	21
II.8.1 Métabolites antimicrobiennes non peptidiques	22
II.8.1.1 Acide organique	22
II.8.1.2 Peroxyde d'hydrogène	22
II.8.1.3 Diacétyl	22
II.8.1.4 Reutérine	22
II.8.2 Métabolites antimicrobiennes peptidique : Bactériocines	23
II.8.2.1 Définition	23
II.9 Application des bactéries lactiques	24
II.9.1 Fermentation et alimentation	24
II.9.2 Domaine de la conservation alimentaire (bio préservation)	24
II.9.3 Domaine de la santé et de la nutrition	24
II.9.4 Domaine des aliments fonctionnels et boissons probiotiques	25
<i>Matériel et méthodes</i>	<i>26</i>
1. Objectif	27
2. Lieu et période d'étude	27
3. Echantillonnage	27
3.1 Origine des échantillons	27
3.2 Procédure de prélèvement et de transport	28
4. Analyses physico-chimiques des échantillons de lait de vache	30
4.1. Mesure du pH	30
4.2. Détermination de l'acidité titrable	30
5. Analyse microbiologique	31
5.1 Etude la qualité sanitaire du lait de vache	32
5.1.1 Préparation des dilutions	32
5.1.2 Recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)	33
5.1.3 Recherche des Staphylococcus	33
5.1.4 Recherche coliforme totaux	33
5.1.5 Recherche sur les levures et les moisissures	34
5.2 Isolement et purification des bactéries lactiques	35
5.2.1 Isolement	35
5.2.2Purification isolats bactériens	35
5.3 Conservation des isolats	35
5.4 Identification des isolats	36
5.4.1 Caractères morphologiques	36
5.4.1.1 Examen macroscopique	36
5.4.1.2 Examen microscopique	36
5.4.2 Etude des caractères physiologiques et biochimiques	38

5.4.2.1 Recherche de la catalase	38
5.4.2.2 Type fermentaire	38
5.4.2.3 Milieu Mannitol-mobilité	38
5.4.2.4 Croissance à différentes températures	39
5.4.2.5 Croissance à différentes concentrations de NaCl	39
5.4.2.6 Croissance à différents pH	39
5.4.2.7 Test thermorésistance	40
5.4.2.8 Test Exopolysccharides (EPS)	40
5.4.2.9 Croissance sur le lait bleu de Sherman	40
5.5 Test de résistance aux antibiotiques	40
5.6 Étude de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques	43
5.6.1 Méthode de double couche (méthode de Fleming <i>et al.</i> , 1975)	43
5.6.2 Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)	44
5.6.3 Activité microbienne vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	44
Résultats et discussion	46
Résultats et discussion	47
1. Résultats des analyses physico-chimiques	47
1.1 Résultats du pH	47
1.2 Résultats de l'acidité Dornic	47
2. Résultats de l'étude la qualité sanitaire des échantillons de lait de vache	48
2.1 Résultats de la flore mésophile aérobie totale (FTAM)	48
2.2 Résultats de la recherche des Coliformes totaux	50
2.3 Résultats de la recherche de <i>Staphylococcus</i>	51
2.4 Résultats de la recherche des levures et des moisissures	53
3. Résultats de l'isolement des isolats lactiques	54
4.1 Examen macroscopique	55
4.2 Purification des isolats	55
4.3 Identification des isolats	56
4.3.1 Examen microscopique	56
5. Résultats des caractères biochimiques	57
5.1 Résultat du test catalase	57
5.2 Résultats du type fermentaire	57
5.3 Résultats du test Mannitol-Mobilité	58
5.4. Résultats de la croissance sur lait de Sherman	58
6. Résultats des caractères physiologiques	60
6.1 Test Exopolysccharides	61
7. Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques	62

8. Résultats de l'activité antimicrobienne	65
8.1 Résultats de la méthode de Fleming <i>et al.</i>, (1975)	65
8.2 Résultats de la méthode de Barefoot et Klaenhammer	65
<i>Conclusion et perspective</i>	67
<i>Références bibliographiques</i>	70
<i>Annexes</i>	79

Liste des figures

FIGURE 1 : <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> OBSERVÉE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE (CORRIEU ET LUQUET, 2008).....	14
FIGURE 2 : <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> OBSERVÉE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE (WALLACE ET AL., 2003).....	15
FIGURE 3 : <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> OBSERVÉE ÉLECTRONIQUE (CORRIEU ET LUQUET, 2008) .	15
FIGURE 4 : <i>ENTEROCOCUS FEACALIS</i> OBSERVÉE MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE (WALLACE ET AL., 2003)	16
FIGURE 5 : <i>BIFIDOBACTERIUM SP</i> (WALLACE ET AL., 2003).....	16
FIGURE 6 : DIFFÉRENTS TYPES DE FERMENTATION (AXELSSON, 2004).....	18
FIGURE 7 : STRUCTURE DE LA REUTÉRINE 3 - HYDROXYPROPANAL (AXELSSON, 2004).....	23
FIGURE 8 : PLAN EXPERIMENTAL	29
FIGURE 9 : PPAREIL DE MESURE DU PH.....	30
FIGURE 10 : ESURE DE L'ACIDITÉ TITRABLE	31
FIGURE 11 : RÉALISATION D'UNE SÉRIE DE DILUTIONS	32
FIGURE 12 : BOITES DE PÉTRI CONTENANT LES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS	34
FIGURE 13 : EXEMPLE DE RÉSULTA DE LA COLORATION DE GRAM	37
FIGURE 14 : RÉSULTAS D'UN ANTIBIOGRAMME (KETZ, 2016).....	43
FIGURE 15 : NOMBRE DE COLONIES DE LA FLORE MÉSOPHILE AÉROBIE TOTALE ET ASPECT MACROSCOPIQUE (FMAT) SUR MILIEU PCA (ÉCHANTILLON DE LAIT 1).....	49
FIGURE 16 : NOMBRE DE COLONIES DE LA FLORE MÉSOPHILE AÉROBIE TOTALE ET ASPECT MACROSCOPIQUE (FMAT) SUR MILIEU PCA (ÉCHANTILLON DE LAIT 2).....	49
FIGURE 17 : ASPECT DES COLIFORMES TOTAUX SUR GÉLOSE DESOXYCHALATE ; A : ECHANTILLON DE LAIT 1 PRÉSENTANT UNE ABSENCE DE CROISSANCE ; B : ECHANTILLON DE LAIT 2 PRÉSENTANT DES COLONIES DE COLIFORMES	50
FIGURE 18 : ASPECT MACROSCOPIQUE DU MILIEU CHAPMN ; A: ECHANTILLON 1 PRÉSENTE UNE ABSENCE DE CROISSANCE B : ECHANTILLON 2 PRÉSENTE UNE CROISSANCE D'UNE SEULE COLONIE	51
FIGURE 19 : TEST D'ORENTATION ; A : RÉSULTAT DU TEST DE LA CATALASE ; B : OBSERVATION MICROSCOPIQUE APRÈS LA COLORATION DE GRAM (Gr X 100).....	52
FIGURE 20 : ASPECT MACROSCOPIQUE DE LA CROISSANCE FONGIQUE SUR MILIEU SABOURAUD . A : ABSENCE DE CROISSANCE POUR L'ECHANTILON 1. B: PRÉSENCE D'UNE COLONIE FONGIQUE DANS L'ÉCHANTILON 2.	53
FIGURE 21 : RÉSULTATS DE L'ISOLEMENT DES GERMES LACTIQUES SUE MILIEU MRS ET M17	55
FIGURE 22 : PURIFICATION DES ISOLATS LACTIQUES L2 (M17) ET L4 (MRS).....	55
FIGURE 23 : ASPECT MICROSCOPIQUE DES ISOLATS L2, L4 ET R1 (GrX100). A: COCCI ISOLÉES OU DIPLOCOQUES ; B: BACILLES COURTS ; C: BACILLES LONGS.....	56

FIGURE 24 : RÉSULTATS DU TEST DE TYPE FERMENTAIRE	57
FIGURE 25 : A: RÉSULTATS DU TEST MANNITOL-MOBILITÉ ; B: ISOLATS L1 PAR RAPPORT TÉMOIN	58
FIGURE 26 : RÉSULTATS DU TEST LAIT DE SHERMAN AU BLEAU DE MÉTHYLÈNE. A: LAIT DE SHERMAN AU BLEU DE MÉTHYLÈNE 1% ; B : LAIT DE SHERMAN AU BLEU DE MÉTHYLÈNE 3%.	59
FIGURE 27 : ABSENCE DE PRODUCTION D'EPS CHEZ LES ISOLATS ÉTUDIÉS	62
FIGURE 28 : RÉSULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME DES SOUCHES L2, L3 ET L4	64
FIGURE 29 : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES SOUCHES LACTIQUES VIS - À - VIS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> PAR MÉTHODE DE DOUBLE COUCHE (A) ET MÉTHODE DES PUIT (B) RÉSULTATS NÉGATIF.	66
FIGURE 30 : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUE DES SOUCHES LACTIQUES VIS-À-VIS D' <i>E. COLI</i> (A) ET <i>CANDIDA ALBICANS</i> (B) PAR LA MÉTHODE DES PUIT.	66

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSITION D'UN LITRE DE LAIT (LESCURE ET BLANC, 2002)	6
TABLEAU 2 : COMPOSITION MINÉRAL DU LAIT DE VACHE (JEANTET ET AL.,2007)	6
TABLEAU 3 : FLORE INDIGÈNE DU LAIT CRU (VIGNOLA, 2002)	8
TABLEAU 4 : GERMES CONTAMINANT LE LAIT CRU (JAKOB ET AL., 2009	9
TABLEAU 5 : PRINCIPAUX GERMES PATHOGÈNES DU LAIT (FLEURETTE, 2003	10
TABLEAU 6 : PRINCIPAUX GENRES DE BACTÉRIES LACTIQUES	13
TABLEAU 7 : DÉTAILS CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS	28
TABLEAU 8 : LA LISTE DES ANTIBIOTIQUES UTILISÉS	42
TABLEAU 9 : RÉSULTATS DES ANALYSES PHYSICO - CHIMIQUES	48
TABLEAU 10 : RÉSULTATS DES ÉTUDES DE LA QUALITÉ SANITAIRE DES DEUX LAITS	53
TABLEAU 11 : LES CODES DES ISOLATS LACTIQUES ISOLÉES	54
TABLEAU 12 : RÉSULTATS DES CRITÈRES BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES ISOLATS LACTIQUES	60
TABLEAU 13 : RÉSULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME- ZONE D'INHIBITION ET INTERPRÉTATION	63
TABLEAU 14 : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUE DES ISOLATS DE BACTÉRIES LACTIQUES	65

Liste des abréviations

LAB : Lactic Acid Bacteria
PH : Potentiel Hydrogène
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
Pb : Paire de base
G+C : Guanine + cytosine
ATP : Adénosine Triphosphate
PCR : polymerase chaine Reaction
RAPD :Random Amplified polymorphic DNA
API : Analytical profil Index
APILAB : logiciel d'identification biochimique API
BAL : Bactéries Acides lactiques
CO² : Dioxyde de carbone
H²O² : Peroxyde d'hydrogène
MRS : De Man , Rogosa and Sharpe
Pi : phosphate inorganique
PTS : phosphotransferase system
RTA : Réponse de tolérance à l'acidité
FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale
UFC/mL : Unité Formant Colonie par millilitre
PCA :Plate Count Agar
ADNr :Acide Désoxyribonucléique ribosomique
FBA :Fructose Bisphosphate Aldolase
F6PPK : Fructose-6-Phosphate Phosphocétolase
NaOH : **Hydroxyde de sodium**
EPS : Exopolysaccharides
D° : Degré Dornic
C° :Degré Celsius
NaCl :Chlorure de sodium
CHL : Carbohydrate Lactique
S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E.coli : *Escherichia coli*

C. albicans : *Candida albicans*

UI : Unité internationale

Introduction

Le lait, sous sa forme naturelle, est un aliment unique qui nourrit les êtres humains depuis des siècles. Il fournit une protection immunogène et fournit des nutriments, tels que des protéines, des graisses, des glucides, des vitamines et des minéraux, sous une forme facilement digestible que tout autre aliment (KAKATI et al., 2021). Toutefois, sa richesse nutritive favorise également la multiplication de nombreux microorganismes capables d'influencer sa qualité microbiologique et technologique. Le lait est stérile dans la mamelle d'un animal sain. Après la traite, l'analyse microbiologique décèle presque toujours la présence de micro-organismes variés. Leur nombre dépend de l'application plus ou moins rigoureuse de mesures d'hygiène relatives à la traite et à la désinfection du matériel. On admet qu'un lait cru de bonne qualité contient moins de 100 000 micro-organismes par millilitre. La plupart de ces micro-organismes sont d'origine tellurique : ce sont des bactéries ou champignons saprophytes des eaux ou du sol. On les retrouve à la fois sur la mamelle et sur l'herbe (contact herbe/mamelle dans les pâturages) ou dans l'eau servant au lavage de l'appareil de traite.

Parmi cette microflore, les bactéries lactiques prennent une place majeure en raison de leur rôle dans les processus de fermentation. Ces microorganismes, non sporulés, utilisent les sucres présents dans le milieu pour produire principalement de l'acide lactique (Carr et al., 2002). Les bactéries lactiques sont naturellement retrouvées dans le lait cru, les végétaux ainsi que dans le tube digestif des animaux et de l'homme. Leur activité métabolique contribue à l'acidification du milieu, Elle contribue à améliorer les qualités organoleptiques des aliments et à inhiber la prolifération de nombreux micro-organismes indésirables (Ammor et al., 2006). En plus de leur rôle dans les procédés de fermentation traditionnels, les bactéries lactiques présentent aujourd'hui un intérêt grandissant dans plusieurs domaines (alimentaire, agroalimentaire, santé...).

Dans ce contexte, notre travail a fait l'objet d'une étude sur des isolats lactiques isolées à partir du lait de vache provenant de deux régions, Ain Témouchent et Tlemcen. Parmi les objectifs de cette étude, est tout d'abord isoler des bactéries lactiques à partir du lait cru de vache, ensuite purifier et caractériser les isolats lactiques. Après leur identification, les bactéries lactiques ont fait l'objet d'une étude d'évaluation de leurs antimicrobiennes vis-à-vis de trois germes pathogènes. Enfin, ce mémoire est achevé par un test de sensibilité et/ou de résistance des bactéries lactiques vis-à-vis de dix antibiotiques.

Le mémoire comprend trois chapitres, après une introduction justifiant l'intérêt de ce travail, le premier chapitre est consacré à la présentation d'une synthèse bibliographique consacrée essentiellement à quelques généralités sur le lait (composition, caractéristiques, flore microbienne du lait et action de la flore du lait). Ce chapitre est complété par un volet sur les bactéries lactiques (définition et caractéristiques des bactéries lactiques, classification et principaux genres de bactéries lactiques, métabolisme et intérêt des bactéries lactiques). Le second chapitre expose la partie expérimentale. Dans ce chapitre, tous les protocoles expérimentaux sont décrits. Le troisième et dernier chapitre présente les résultats et leurs discussions. Enfin, ce travail est achevé par une conclusion et quelques perspectives.

Revue Bibliographique

I. GENERALITE SUR LE LAIT

I.1 Le lait

Le lait représente le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière en bonne santé et correctement alimentée et bien portante. Il est destiné à la consommation humaine et à la production des produits laitiers (yaourts, fromages). Cette définition a été adoptée lors du Congrès international pour la répression des fraudes en 1909. Le lait doit être exempt de colostrum et être obtenu dans des conditions hygiéniques et sûres. Par ailleurs, le terme « lait » désigne spécifiquement le lait de vache lorsqu'aucune autre origine n'est précisée (**Larpent, 1997**). Le lait, un fluide biologique complexe et riche en nutriments, constitue une source essentielle de nourriture pour les humains et les animaux. Il comprend un large éventail de macro- et micro-constituants, notamment des protéines, des graisses, des glucides, des vitamines et des minéraux (**Acquaviva et al., 2025**).

Le lait cru de vache est une source potentielle des bactéries lactiques (LAB), qui est l'une des bactéries les plus couramment utilisées pouvant apporter des bienfaits alimentaires et sanitaires liés à leur capacité à produire des métabolites secondaires et des protéines fonctionnelles (**Kouadri et al., 2023**).

I.2 Composition biochimique de lait

La composition du lait varie en fonction de divers éléments tels que l'espèce et la race de l'animal, son régime alimentaire, la période de l'année (saison) et le stade de lactation. Il est gorgé de protéines, de lipides et de lactose, faisant de lui un aliment hautement nutritif (**Gallier et al., 2020**). Des composés volatils, comme certaines lactones et aldéhydes sont responsables de son parfum caractéristique (**Potts et Peterson, 2019**), alors que des vitamines, minéraux et acides organiques renforcent le système immunitaire et affectent ses propriétés sensorielles (**Pereira, 2014 ; Zhao et al., 2023**).

L'eau constitue de 81 à 87 % du lait et favorise la dissolution des protéines et des minéraux (**Amiot et al., 2002**). Le lactose, qui est le sucre principal, joue un rôle crucial dans la fermentation effectuée par les bactéries lactiques (**Perreau, 2014 ; Roca-Fernandez, 2014**). Les triglycérides, qui sont une forme de lipides, constituent une source d'énergie considérable, contenant approximativement 65 % d'acides gras saturés et 35 % d'acides insaturés (**Jeantet et al., 2008**). Les protéines, telles que les caséines et les protéines de lactosérum fournissent

tous les acides aminés indispensables et jouent un rôle essentiel dans la fabrication du fromage (**Pougheon, 2001**).

I.2.1 Composition d'un litre de lait

Le lait de vache recèle une grande richesse de constitution. En moyenne, un litre de lait cru contient près de 900 ml d'eau et 130 g d'extrait sec, en proportion variable. Le tableau 1, présente la composition d'un litre de lait de vache.

Tableau 1 : Composition d'un litre de lait (Lescure et Blanc, 2002)

Matière grasse	35 à 45 g
<u>Lactose</u>	47 à 52 g
<u>Matière azotés</u> : caséine, protéines de lactosérum (albumines et globulines)	27 g ; 6 g
<u>Eléments minéraux</u> : calcium, phosphore, potassium, chlore, sodium et magnésium	1,3g ; 1 g ; 1,6 g ; 1.1g ; 0,5 g ; 0,14 g

Le lait est également riche en différentes vitamines et minéraux (**Veisseyre, 1997 ; Gaucheron, 2005**) sans oublier environ une cinquantaine d'enzymes qui contribuent à sa qualité et à ses caractéristiques biochimiques (**Pougheon, 2001**). Le tableau 2, présente la composition minérale du lait de vache.

Tableau 2 : Composition minéral du lait de vache (jeantet *et al.*, 2007)

Elément minéraux	Concentration (mg, kg-1)
Calcium	1043 – 1283
Magnésium	97 – 146
Phosphate inorganique	1805 – 2185
Citrate	1323 – 2079
Sodium	391 – 644
Potassium	1212 – 1207
Chlorure	772 – 1207

I.3 Propriétés physico-chimiques du lait

Les caractéristiques physico-chimiques du lait restent généralement constantes et sont déterminées par sa composition globale ainsi que par les substances et ions qu'il contient. Dans l'industrie laitière, des paramètres tels que la densité, le pH, l'acidité, tout comme les points de congélation et d'ébullition sont essentiels (**Vignola, 2002**).

I.3.1 Densité

La densité est un indicateur physique important pour évaluer la qualité du lait. Elle est généralement supérieure à celle de l'eau, se maintenant entre 1,027 et 1,028 g/mL, en accord avec les normes de qualité du lait. Cette propriété aide à détecter certaines tromperies, comme la dilution à l'eau (**Rahmadini et al., 2024**).

I.3.2 Acidité

L'acidité normale du lait, présente dès le départ, est liée aux protéines, aux sels minéraux et aux acides organiques (**Vignola, 2002**). Au fil du temps, la fermentation du lactose par les bactéries lactiques crée de l'acide lactique, ce qui augmente l'acidité et aide à la coagulation.

I.3.3 pH

Le pH du lait de vache est un peu acide, souvent entre 6,4 et 6,8 (**Helmenstine, 2019**). Il baisse pendant la fermentation, alors que certains cas particuliers, comme la mammite peut causer une hausse du pH.

I.3.4 Point de congélation et point d'ébullition

La température de congélation du lait est généralement aux alentours de -0,50 à -0,52 °C. Cette température est plus basse que celle de l'eau grâce à la composition du lait en lactose et en sels minéraux. Pour ce qui est du point d'ébullition, il dépasse légèrement celui de l'eau et atteint environ 100,16 °C. On a fréquemment recours à ces critères pour contrôler la qualité et la véracité du lait (**Rahmadini et al., 2024**).

I.4 Flore microbienne du lait

Le lait obtenu par une traite aseptique n'est pas stérile. Il contient 1 000 à 5 000 microorganismes par millilitre, essentiellement des Lactobacilles et des Streptocoques

lactiques commensaux du pis et des canaux galactophores. Le lait, avec sa richesse nutritive crée un milieu favorable à la multiplication de divers microorganismes. Cette microflore provient de plusieurs sources, telles que la glande mammaire de l'animal, le cadre environnant à la ferme ainsi que le matériel employé pendant le processus de traite. La composition microbienne du lait joue un rôle prédominant dans la détermination de sa qualité, sa conservation et sa sécurité sanitaire. Elle comprend non seulement des micro-organismes bénéfiques, tels que les bactéries lactiques qui stimulent la fermentation, mais aussi d'autres micro-organismes qui peuvent entraîner l'altération du lait ou des maladies (Yuan, H *et al.*, 2022). La flore du lait comprend une flore constante et une flore accidentelle.

I.4.1 Flore indigène (originelle = constante)

La flore indigène correspond aux microorganismes présents naturellement dans le lait dès sa sortie de la glande mammaire. Cette microflore initiale provient principalement du canal du trayon et dépend de plusieurs facteurs tels que l'alimentation de l'animal, sa race ainsi que certaines conditions physiologiques et environnementales. Elle est généralement dominée par des microorganismes mésophiles (Vignola, 2002). Parmi cette flore naturelle, les bactéries lactiques occupent une place importante. Elles possèdent la capacité de fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique, ce qui entraîne une diminution du pH du lait. Les genres les plus fréquemment rencontrés sont notamment : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Aerococcus* (Conte, 2008). Le tableau 3, présente la flore indigène du lait cru.

Tableau 3: Flore indigène du lait cru (vignola, 2002)

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

I.4.2 Flore accidentelle

La flore accidentelle correspond à l'ensemble des microorganismes introduits dans le lait après la traite. Le lait peut être contaminé par divers microorganismes de l'environnement tels que les *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Microcoques*, *Corynébactéries*, *Bacillus*... . Le lait peut être contaminé par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière. Elle est constituée d'une flore d'altération, qui provoque des défauts sensoriels de goût, d'arômes ou réduit la durée de conservation des produits. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'Entérobactéries coliformes et d'éventuellement d'Entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*, *Camylobacter*. Le tableau 4, présente les germes contaminant le lait cru.

Tableau 4 : Germes contaminant le lait cru (Jakob *et al.*, 2009).

Sources de contamination		Psychrotrophes
Germes Gram positifs		
Germes sporulés aérobies	Terre, poussière, foin (très répandu)	Certaines espèces
Germes sporulés anaérobies (clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, boue	Non
Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
Microcoques	Peau, résidus de lait	Certaines espèces
Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
Bactéries lactiques	Plantes, ensilages, résidus de lait, muqueuses	Non
Bactéries corynéformes	Peau, sol	Certaines espèces
Germes Gram négatifs		
Colibactéries (<i>E. coli</i>)	Fèces, eaux usées	Non
Entérobactéries	Plantes, fèces, eaux usées	Certaines espèces
<i>Pseudomonas</i>	Eau, sol (très répandu)	Non
<i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , etc	Eau, sol (très répandu)	Non
Levures	Sol, plantes, résidus de lait (très répandues)	Non

I.4.2.1 Flore d'altération

La flore d'altération regroupe les microorganismes capables de modifier les caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques du lait. Ces bactéries produisent différentes enzymes, notamment des protéases et des lipases, responsables de la dégradation des protéines et des lipides présents dans le lait. Parmi ces micro-organismes, les bactéries Psychrotrophes telles que *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* et Bacille jouent un rôle important dans l'altération du lait, en particulier lorsque celui-ci est conservé à basse

température pendant une période prolongée. Leur activité peut entraîner l'apparition de défauts affectant le goût, l'odeur et la texture du produit (**Quigley et al., 2013 ; Murphy et al., 2016**). Certaines espèces de bactéries sont responsables d'intoxications alimentaires.

I.4.2.2 Flore pathogène

Les laits d'animaux malades peuvent enfin contenir des germes pathogènes pour l'homme. Parmi ces germes : *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Listeria*, ainsi que différents virus. Ceci explique l'importance d'un contrôle sanitaire rigoureux (**Lamontagne et al., 2002**). Trois origines principales peuvent expliquer la présence de micro-organismes pathogènes dans le lait : les animaux malades, l'environnement et l'Homme. Parmi les bactéries pathogènes pouvant être présentes dans le lait cru, on peut citer *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* et *Shigella sonnei*. Il est possible que certaines moisissures posent également un risque pour la santé en raison de leur production de mycotoxines (**Gouttaya et al., 2013**). Le tableau 05, présente les principaux germes pathogènes présents dans le lait

Tableau 5: Principaux germes pathogènes du lait (**fleurette, 2003**)

Espèce	Risques
<i>E. coli</i>	Graves toxi-infections Accidents de fabrication : défaut d'respect, gonflement, défaut de gout (acide, aigre, piquant).
<i>S. aureus</i>	Toxi-infection de gravité variable redoutable chez l'enfant (syndrome gastro-intestinal).
<i>Listeria monocytogenes</i>	La listériose (méningites, encéphalites et avortement).
<i>Salmonella</i>	Les salmonelloses (fièvre typhoïde et paratyphoïde, des gastro-entérites et toxi-infections alimentaires collectives.

II. GENERALITE SUR LES BACTERIES LACTIQUES

II.1 Historique

L'intérêt scientifique pour les bactéries lactiques remonte à la fin du XIX^e siècle, lorsque les chercheurs ont commencé à étudier leurs caractéristiques biologiques en raison de leur rôle important dans les processus de fermentation. Ces micro-organismes non pathogènes ont fait l'objet d'une classification détaillée du fait de leur grande diversité. Cette classification a été particulièrement influencée par les travaux de Sigurd Orla-Jensen, qui a proposé une première classification basée sur leur morphologie et leur caractéristique physiologique (**Labioui et Elmoualdi, 2005**). Les premières études ont mis en évidence la présence de bactéries lactiques dans le lait. En 1973, le scientifique Joseph Lister est parvenu à isoler ces bactéries en culture pure. Elles étaient alors connues sous le nom *Bacterium lactis*, et sont aujourd'hui appelées *Lactococcus lactis* (**Ketrouci, 2021**).

II.2 Définition et caractères généraux

Les bactéries lactiques sont essentielles pour leurs applications nutritionnelles et industrielles, sont des micro-organismes procaryote, classées dans l'ordre des *lactobacillales* (phylum des *Firmicutes*). Ce groupe comprend une grande diversité d'espèces présentant différentes formes (coques ou bacilles) partageant toutes les caractéristiques biologiques essentielle de convertir les sucres en acide lactique lors de la fermentation (**Al-Kharousi, 2025**). Bien qu'elle préfèrent des températures modérées, leur température optimum varie de 25°C à 35°C. Elles supportent des pH allant de 4 à 8 (**Luis et al., 2007**).

Sur le plan physiologique, ces bactéries sont caractérisées par une paroi cellulaire Gram positive, non sporulées et sont souvent catalase-négatives. Ce sont des anaérobies facultatifs, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène (**Anumudu et al., 2024**).

Selon leur voie de fermentation, les BAL sont classées en deux principaux groupes : homofermentaires et hétérofermentaires. Les BAL homofermentaires produisent principalement de l'acide lactique comme unique produit final de la fermentation, convertissant une molécule de glucose en deux molécules de lactate. En revanche, les BAL hétéro fermentaires suivent une voies métabolique plus complexe, produisant un mélange de sous- produits dont, du lactate, de l'éthanol et du dioxyde de carbone, à partir de la fermentation d'une seule molécule de glucose (**Anumudu et al., 2024**). Elles sont exigeantes

sur le plan nutritionnel, en ce qui concerne les vitamines (vitamine B), les acides aminés, les acides gras et les glucides (**Mameche, 2008**). Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30% et 60% et une taille de génome compris entre 1,8 et 3,3 paires de base (pb) (**Makhloufi, 2011**).

II.3 Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très répandues dans la nature. Elles peuvent vivre en symbiose avec les humains et les animaux, colonisant naturellement le tube digestif et l'appareil génital. Cette colonisation contribue au maintien de l'équilibre microbien par la production d'acides organiques et de composés qui inhibent la croissance des agents pathogènes (**Klein et al., 1998**). Par exemple, dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages...). Aussi, dans le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*. Par ailleurs, l'appareil génital chez les femmes est colonisées par ce genre des bactéries, telles que *Lactobacillus* (**Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et al., 2009**).

II.4. Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BAL) font partie au phylum des *Firmicutes*, à la classe *Bacilli* et à l'ordre *Lactobacillales*. Parmi elles, on trouve plusieurs genres bien connus tels que *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*, tandis que certaines espèces moins connues comme *Aerococcus*, *Oenococcus* et *Weissella*, contribuent également à la diversité du groupe (**De Angelis et al., 2007 ; Reddy et al., 2008**), elles se distinguent par une faible teneur en guanine-cytosine (inférieure à 50 %). Des autres incluent aussi les genres *Atopobium* et *Bifidobacterium* (phylum *Actinobacteria*) dans le groupe fonctionnel des bactéries lactiques, en raison de caractéristiques physiologiques et métaboliques communes (**Ferreira, 2012 ; Wedajo, 2015**). La classification des bactéries lactiques a connu une révolution importante au cours du XXe siècle. La première approche systématique a été développée par Orla-Jensen en 1919, basée sur leur forme et certaines caractéristiques physiologiques comme le type de fermentation et l'activité enzymatique (**Orla-Jensen, 1919**). Par conséquent, la classification moderne est basée sur les approches moléculaires, notamment le séquençage de l'ARN 16S, et d'autres méthodes incluent aussi des analyses basées sur l'ADN, comme la mesure de pourcentage de GC ou l'hybridation ADN/ADN, permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux (**Hassaine, 2013**).

II.5. Principaux genres de bactéries lactiques

Tableau 6: Principaux genres de bactéries lactiques

Genre	Forme de cellule	fermentation	l'acide lactique	Espèce
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>A.vridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>C.divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>E.faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaire	D(-) ou L(+) ou D/L	<i>L.delbrueckii</i>
<i>lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D(-)	<i>L.lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>L.mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	L(+) ou D/L	<i>O.oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>P.damosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>S.salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>T.halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes Petits bacilles	Homofermentaire	D/L ou D(-)	<i>V.fluvialis</i>
<i>Weissela</i>		Hétérofermentaire		<i>W.viridescens</i>

Les bactéries lactiques sont associées à plusieurs genres importants notamment. Le tableau 6, présente les principaux genres de bactéries lactiques :

II.5.1 Genre *Lactobacillus*

Le genre de *lactobacillus* regroupe des bactéries lactiques très répandu, principalement utilisées surtout dans la fermentation des aliments. Ces bactéries apparaissent sous formes de Bâtonnets regroupés en chainettes, présentent une coloration gram positive. Elles ne produisent pas de spores, immobiles, elles ne possèdent pas d'activité catalase. Elles se développent à des températures comprises entre 30 à 40°C. En fonction de leur métabolite, on peut diviser les espèces de *lactobacillus* en 3 types : Homofermentaire, hétérofermentaire stricte et facultatives (Kouakou et Thonart, 2011).



Figure 1 : *Lactobacillus casei* observée au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008)

II.5.2 Genre *Lactococcus*

Ce genre présente un habitat typique des plantes, des animaux et de leur produits notamment les produits laitiers. Ces Bactéries présentent une forme sphérique et associées en paires. Elles sont caractérisées par une fermentation de type homofermentaire, produisent principalement de l'acide lactique, ce qui explique son importance dans la fabrication des produits fermentés (Holt *et al.*, 1994 ; Carr *et al.*, 2002 ; Salminen et Von Wright, 2004).

II.5.3 Genre *Leuconostoc*

Les bactéries appartenant au genre *leuconostoc* se distinguent par un métabolisme hétérofermentaire, il s'agit des coques à Gram positive, peuvent organiser en paires ou en

chaines. Ces bactéries sont anaérobies facultatifs, généralement immobiles, présente une catalase négative (Federighi, 2005 ; Savadogo et Traoro, 2011).

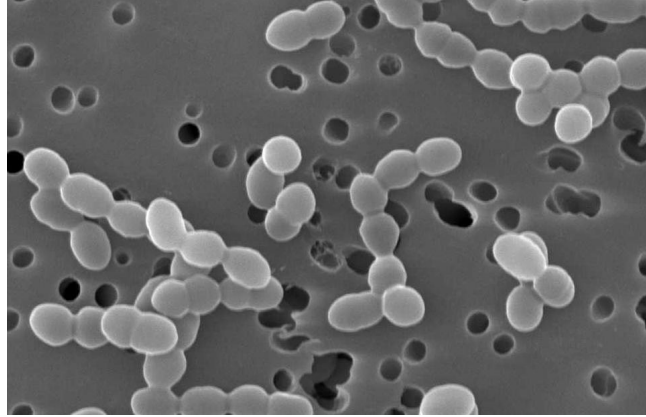


Figure 2 : *Leuconostoc mesenteroides* observée au microscope électronique (Wallace *et al.*, 2003)

II.5.4 Genre *Streptococcus*

Ce genre appartient à la famille des *Streptococcaceae*, ce sont des cocci à Gram positif généralement non mobiles. Ces bactéries sont utilisées dans la fabrication de Yaourt et du fromage souvent en association avec d'autres bactéries lactiques telles que *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* (Savadogo et Traoro, 2011). Parmi les streptocoques rencontrés dans les aliments, l'espèce *Streptococcus thermophilus* possède une grande importance économique, elle est largement utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentée et se caractérise par son caractère non pathogène (Federighi, 2005).

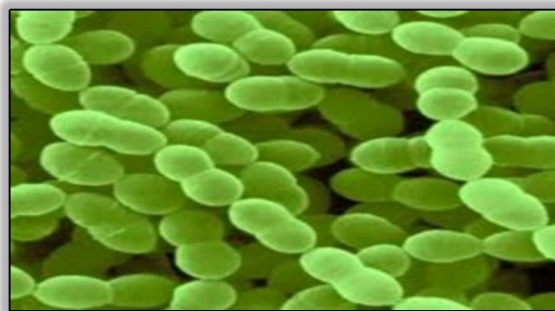


Figure 3 : *Streptococcus thermophilus* observée électronique (corrieu et luquet, 2008)

II.5.5 Genre *Enterococcus*

Le genre *Entéro*coccus regroupe les streptocoques fécaux appartenant au groupe D, ces bactéries sont naturellement présentes comme commensales dans l'intestin des humaines et des animaux, certains espèces peuvent également trouvées dans les aliments. Ces bactéries présentent des formes ovoïde, généralement homofermentaire, possèdent une capacité de fermenter des sucres telles que lesorbitol et l'arabinose (De Vos *et al.*, 2009).



Figure 4 : *Enterococcus faecalis* observée microscope électronique (Wallace *et al.*,2003)

II.5.6 Genre *Bifidobacterium*

Le genre de *Bifidobacterium* appartient au groupe des *Actinobacteria*, ces bactéries sont des bacilles à Gram positif, peuvent se présenter en paires ou en chaines. Selon leurs voies métaboliques sont des hétérofermentaires (Guiraud, 2003).

Ces bactéries colonisent principalement le tractus gastro- intestinal. Les bifidobactéries sont souvent incluses dans la famille des bactéries lactiques (LAB), avec une teneur en G+C variant de 42% à 67% (Klein *et al.*, 1998 ; Savadogo et Traoro 2011) .

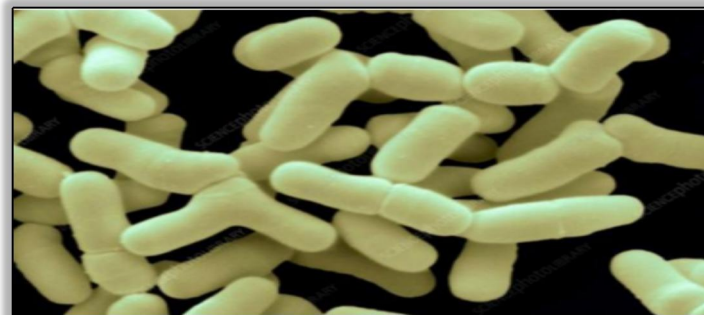


Figure 5 : *Bifidobacterium sp* (Wallace *et al.*, 2003)

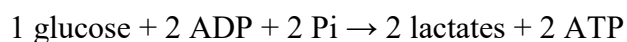
II.6 Voies métaboliques

Les bactéries lactiques tirent leur énergie principalement de la fermentation des glucides, tels que le lactose, Glucose, fructose et le saccharose, ces bactéries sont incapables de réaliser une respiration cellulaire, elles produisent de l'énergie par un métabolisme fermentaire conduisant principalement à la formation d'acide lactique en conditions anaérobies. Pour être métabolisés, les sucres du milieu extérieur doivent d'abord traverser la membrane cellulaire grâce à des systèmes de transport actif. Selon la voie métabolique empruntée et les produits finaux de la fermentation, les bactéries lactiques sont classés en deux groupes : des bactéries Homofermentaire et des bactéries Hétérofermentaires (**Dridier et Prévost, 2009 ; Hassaine, 2013**).

II.6.1 Homofermentaire

La voie homofermentaire repose sur l'utilisation complète du glucose, phosphorylé en glucose-6-phosphate, qui est métabolisé jusqu'au pyruvate. Ce type de fermentation est principalement caractéristique des bactéries appartenant aux genres *lactococcus*, *pediococcus*, *streptococcus* et *lactobacillus*. . En conditions optimales de croissance, la glycolyse aboutit à la formation de deux molécules de lactate accompagnées de la synthèse de deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose (**Dridier et Prévost, 2009**).

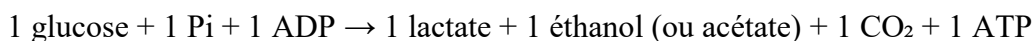
La réaction globale de cette fermentation peut être exprimée comme suit :



II.6.2 Hétérofermentaire

Certaines bactéries lactiques, en particulier celles appartenant aux genres *lactobacillus* et *leuconostoc*, se caractérisent par l'absence de l'enzyme fructose-1-6-bisphosphate aldolase (FBA), ainsi que du système de transport phosphotransférase (PTS). En raison de cette particularité enzymatique, ces microorganismes ne suivent pas la voie glycolytique classique pour la dégradation du glucose. A la place, ils utilisent une voie fermentaire alternative conduisant à la formation de plusieurs produits métaboliques, notamment l'acide lactique, l'éthanol (ou parfois l'acétate) et le dioxyde de carbone. Cette transformation s'accompagne également de la production d'une molécule d'ATP, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à la cellule (**Dridier et Prévost, 2009 ; Hadeif, 2012**).

La réaction globale de cette fermentation peut être exprimée comme suit :



II.6.3 Voie bifide

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* possèdent une voie métabolique spécifique appelée voie bifide ou voie du fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK). Ces bactéries sont principalement saccharolytiques et disposent d'un grand nombre d'enzymes impliquées dans la dégradation des glucides, ce qui leur permet de fermenter différents sucres tels que le glucose, le galactose et le fructose. Au cours de cette fermentation, les sucres sont transformés principalement en acétate et lactate, avec un rapport molaire d'environ 3:2, tout en produisant de l'énergie sous forme d'ATP. Cette voie métabolique est caractéristique des bifidobactéries et complète l'activité de la voie des pentoses phosphates dans le métabolisme des sucres (Scardovi, 1965 ; Van de Broek *et al.*, 2008 ; Scuotto, 2015).

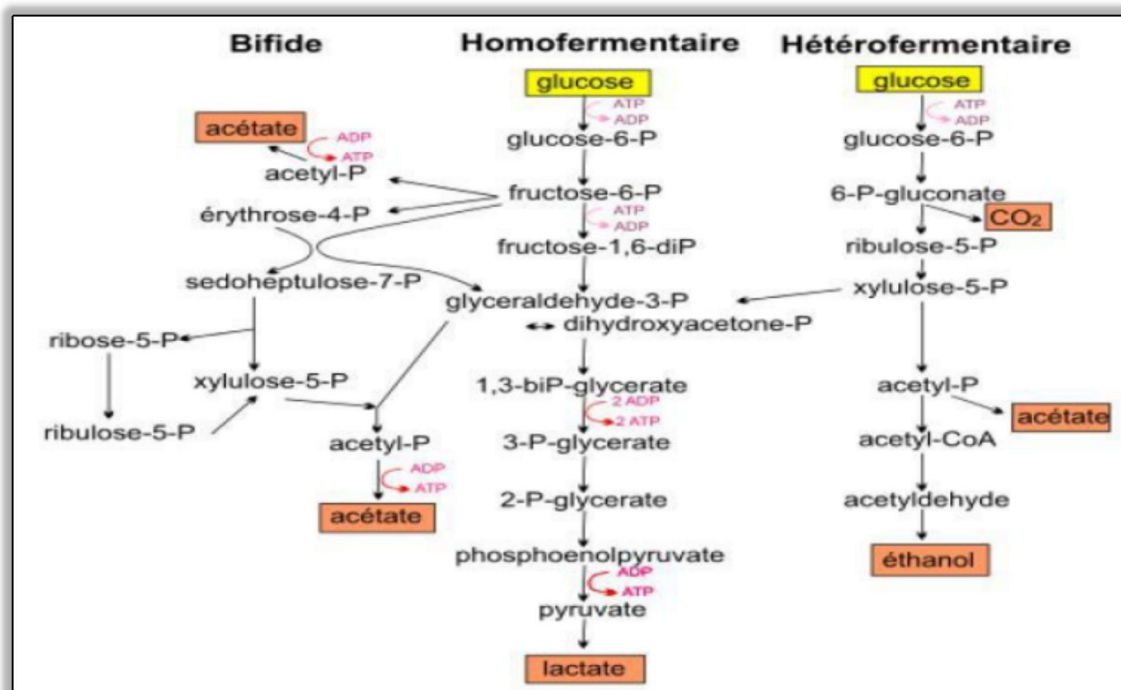


Figure 6 : Différents types de fermentation (Axelsson, 2004)

II.7 Identification des bactéries lactiques

L'identification des bactéries lactiques reposait initialement sur des critères classiques tels que les caractéristiques morphologiques, phénotypiques, biochimiques et physiologiques (Carr *et al.*, 2002). Par la suite, ces méthodes ont été complétées par l'utilisation de marqueurs chimio-taxonomiques, notamment l'analyse de la composition des acides gras

cellulaires, l'étude des protéines totales ainsi que d'autres propriétés cellulaires. Néanmoins, les méthodes basées sur les informations génotypiques offrent aujourd'hui une identification plus précise et plus fiable. Ainsi, les techniques moléculaires telles que le séquençage de l'ADNr 16S, la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), le ribotypage, ainsi que d'autres approches similaires jouent actuellement un rôle important dans la taxonomie moderne des bactéries lactiques (Sun *et al.*, 2014).

II.7.1 Identification phénotypique

Les colonies isolées sur les milieux de dénombrement peuvent être identifiées à l'aide de méthodes phénotypiques, reposant sur des tests physiologiques et biochimiques. Cette étude s'appuie sur l'observation macroscopique et microscopique des colonies, ainsi que sur la réalisation de tests physiologiques et biochimiques.

II.7.1.1 Examen macroscopique

Cet examen permet de mettre en évidence la morphologie des colonies développées sur les boîtes de Pétri à l'aide d'une loupe binoculaire. Les colonies isolées sont soumises à une observation macroscopique détaillée afin de déterminer leurs caractères culturels, tels que la forme, l'aspect, la taille, la couleur, la disposition et le contour (Zergoug, 2017).

II.7.1.2 Examen microscopique

L'observation microscopique après coloration différentielle (coloration de Gram) permet de différencier les isolats selon le type de Gram (positive ou négative), de leur morphologie (bacilles ou coques) ainsi que de leurs modes d'association (cellules isolées, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques se caractérisent par une réaction de Gram positive (Carr *et al.*, 2002).

II.7.1.3 Recherche de la production de gaz (type fermentaire)

Ce test permet de déterminer le type de métabolisme des bactéries à partir de la dégradation du glucose et de la production de gaz carbonique (CO₂) (Hansal *et al.*, 2024). Il permet ainsi de classer les bactéries lactiques en bactéries homofermentaires et des bactéries hétérofermentaires.

II.7.1.4 Identification par galerie API50

L'identification des souches de bactéries lactiques est réalisée à l'aide du système API bio Mérieux, en utilisant la galerie API 50 CH associée au milieu API 50 CHL (bio Mérieux, Marcy-l'Étoile, France). Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu approprié, puis inoculé dans les cupules de la galerie. Au cours de l'incubation, le catabolisme des glucides entraîne la production d'acides organiques, provoquant un changement de couleur de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus permettent d'établir un profil biochimique caractéristique, utilisé pour l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel APILAB (bio Mérieux, Marcy-l'Étoile, France) (Tamminen *et al.*, 2004).

II.7.2 Identification génotypique

Au cours des deux dernières décennies, un large éventail de méthodes basées sur l'ADN a été développé pour l'identification et la détection des micro-organismes. L'un des principaux avantages de ces approches réside dans leur indépendance vis-à-vis des variations des conditions de culture. Les techniques génotypiques offrent différents niveaux de pouvoir discriminant, allant de l'identification au niveau de l'espèce jusqu'au typage des souches individuelles. La plupart de ces méthodes reposent sur le principe de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), qui permet l'amplification sélective de fragments d'ADN ciblés à l'aide d'amorces oligo nucléotidiques dans des conditions de réaction contrôlées (Tamminen *et al.*, 2004).

II.7.3 Action de la flore du lait

Les bactéries de la flore du lait sont susceptibles d'altérer cet aliment par trois processus principaux pouvant, selon les conditions, être plus ou moins associés (Lescure et Blanc, 2002).

- **Fermentation homo et hétérolactiques du lactose avec acidification du lait** : Un tel processus conduit à la précipitation de la caséine et à la prise en masse du lait. Selon la température ambiante, le phénomène sera plus ou moins rapide et les bactéries intervenantes différentes : *Streptococcus lactis* de 10 à 37°C, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* au-dessus de 37°C. A des températures inférieures à 10°C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytiques telles, *Pseudomonas* sp.,

Acinetobacter sp, *Microcoques*... . La coagulation du lait qui est un phénomène préjudiciable pour les laits de consommation constitue la première étape de la fabrication des fromages.

- **Protéolyse** : La conservation du lait cru, de son recueil jusqu'à sa consommation, est causée par une réfrigération aux environs de +4 °C. Cette température sélectionne les groupes bactériens psychrophiles : *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., certains *Streptococcus*..., dont l'activité protéolytique peut s'exercer sur la caséine du lait. Il en résulte une altération lente du lait se traduisant par des modifications organoleptiques :

saveur amère, saveur de pomme de terre. L'activité protéolytique peut aussi se manifester sur le caillé et occasionner des perturbations dans la maturation des fromages.

- **La lipolyse** : De nombreuses espèces psychrophiles proléolytiques sont aussi lipolytiques et dégradent les globules graisseux du lait. C'est le cas de certains *Pseudomonas* sp., de *Bacillus cereus*. Les acides gras insaturés résultant de la lipolyse peuvent être oxydés. En marge de ces trois actions principales de la flore microbienne du lait, il convient de mentionner celle qui conduit au 'filage'. Le filage résulte de la production par certaines bactéries de substances visqueuses. Ces substances sont des polymères du glucose (dextranes) ou de dérivés azotés du glucose. La principale espèce en cause est *Alcaligenes viscosus*. D'autres bactéries peuvent produire des mucilages dans le lait tel *Leuconostoc mesenteroides*. Le lait devient filant, il s'écoule comme un sirop, il peut même former des masses de consistance proche de la gelée. Notons enfin, quelques altérations mineures, *Streptococcus lactis* variété maltigenes donne au lait un goût de caramel, des microorganismes pigmentés peuvent colorer le lait en jaune (*Flavobacterium* sp.) en rouge (*Brevibacterium erythrogenes*) ou bleu (*Pseudomonas synchyanea*).

II.8 Propriété antimicrobienne des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont reconnues par leur capacité à inhiber la croissance des microorganismes non Souhaités .cette fonction antimicrobienne contribue à la valeur nutritionnelle et aux qualités organoleptiques des aliments ,et prolonge leur durée de conservation .cet effet favorise la production de divers composé bioactifs comme le diacétyl, les acides organique , le dioxyde de carbone ,le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines, qui collaborent pour éliminer les agent infectieux (**Ammor et al., 2006**).

II.8.1 Métabolites antimicrobiennes non peptidiques

II.8.1.1 Acide organique

Lors de la fermentation, les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique ainsi qu'une faible quantité d'acide acétique. Ces acides contribuent à inhiber la croissance des levures et des micro-organismes sensibles aux milieux acides (**Mami, 2013**). Ces bactéries possèdent des mécanismes appelés réponse de tolérance à l'acidité (RTA) qui leur permettent de survivre malgré la production de ces acides (**Van de Guchte *et al.*, 2002**). Leur effet antimicrobien est attribué à leur forme non ionisée, capable de pénétrer dans les cellules. Ceci entraîne une diminution du pH intracellulaire, perturbant ainsi les fonctions cellulaires normales (**Mami, 2013**). De plus, certaines bactéries propioniques peuvent convertir le lactate en propionate, en acétate et en dioxyde de carbone. L'acide propionique est très efficace contre la croissance des moisissures et des champignons, même à faibles concentrations (**Leonard, 2013**).

II.8.1.2 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une petite molécule qui pénètre facilement la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule, il peut inhiber la croissance des microorganismes et entraîner leur mort par stress oxydatif, en endommageant des composants essentiels tels que l'ADN, les lipides membranaires et les protéines. Les micro-organismes dépourvus de mécanismes de défense efficaces, notamment d'enzymes comme la catalase, sont les plus vulnérables aux effets du peroxyde d'hydrogène (**Touati, 2000**).

II.8.1.3 Diacétyl

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un produit métabolique généré par diverses bactéries lactiques, y compris *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Pediococcus*. Il confère au beurre un arôme distinctif et très apprécié. Outre cet attrait, ce composé présente une activité antimicrobienne notable contre les bactéries Gram négatif et les levures ; toutefois, son efficacité demeure relativement faible contre les autres bactéries Gram positif (**El-Ziney *et al.*, 1998**).

II.8.1.4 Reutérine

En conditions anaérobies, *Lactobacillus reuteri* produit, lors de la fermentation du glycérol, un composé antimicrobien appelé réutérine. Ce composé, également connu sous le nom de 3-hydroxypropionaldéhyde, inhibe l'activité de certains champignons, protozoaires et virus. Il est efficace contre les bactéries Gram-négatives et Gram positives, son action reposant

principalement sur l'inhibition des fonctions cellulaires microbiennes normales et de la réplication de l'ADN. Ces propriétés suscitent un intérêt grandissant pour les applications potentielles de la réutérine dans les domaines agroalimentaire et médical (**Vollenweider, 2004**).

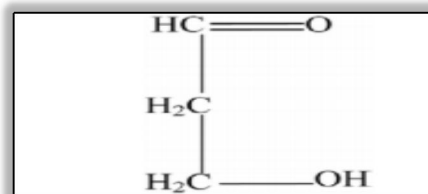


Figure 7 : Structure de la reutérine 3 - Hydroxypropanal (**Axelsson, 2004**)

II.8.2 Métabolites antimicrobiennes peptidique : Bactériocines

II.8.2.1 Définition

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de nature protéique possédant une activité biologique importante. Produites par les ribosomes, elles sont libérées dans le milieu extracellulaire par certaines bactéries. Chargées positivement, elles sont capables d'inhiber un large éventail de micro-organismes pathogènes responsables de divers problèmes de santé (**Meade *et al.*, 2020**). Selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, les bactériocines sont généralement classées en quatre classes principales : I, II, III et IV (**Fernandes *et al.*, 2022**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques présentent plusieurs propriétés intéressantes, notamment une bonne pénétration cellulaire, une diffusion efficace et une faible toxicité (**Molujin *et al.*, 2022**). Ces propriétés présentent un grand intérêt dans divers secteurs, notamment l'industrie agroalimentaire et le domaine médical. Ces substances sont insipides, incolores et inodores, et conservent une forte activité antimicrobienne même en milieu acide et sous l'effet de la chaleur (**Huang *et al.*, 2022**). Leur structure protéique favorise leur dégradation naturelle dans l'organisme, ce qui contribue à limiter le développement de résistances bactériennes par rapport aux antibiotiques classiques et minimise le risque d'accumulation (**Molujin *et al.*, 2022**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, grâce à leur action rapide sur les cellules cibles et à leur grande efficacité à faibles doses, constituent des alternatives prometteuses aux antibiotiques.

II.9 Application des bactéries lactiques

II.9.1 Fermentation et alimentation

Les bactéries lactiques (BAL) jouent un rôle essentiel dans la fermentation des aliments et des boissons, contribuant à améliorer leur valeur nutritionnelle, à garantir leur sécurité microbiologique et à rehausser leur saveur. Différents types de bactéries lactiques augmentent la valeur nutritionnelle des aliments fermentés et produisent des composés bioactifs bénéfiques pour la santé (**Galli *et al.*, 2022**). Des acides gras essentiels et des vitamines sont produits grâce à des bactéries telles que *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* au cours de la fermentation (**CzarnowskaKujawska et Paszczyk, 2021**). Des peptides bioactifs inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) sont également générés, offrant ainsi une protection à l'organisme (**Hernández-Sánchez *et al.*, 2021**). De plus, les propriétés sensorielles et la stabilité des boissons fermentées, comme le kéfir et autres boissons fonctionnelles, sont améliorées (**Vimercati *et al.*, 2020 ; Agirman *et al.*, 2024**).

II.9.2 Domaine de la conservation alimentaire (bio préservation)

Les bactéries lactiques jouent un rôle clé comme conservateurs naturels dans les produits laitiers fermentés. Ces bactéries produisent des acides organiques et de petites protéines aux propriétés antimicrobiennes. Elles inhibent la croissance des micro-organismes indésirables dans les yaourts et le lait (**Amiri *et al.*, 2020**). L'acidification qui suit la fermentation contribue à prolonger la durée de conservation de ces produits et à stabiliser le microbiome (**Guan *et al.*, 2025**).

II.9.3 Domaine de la santé et de la nutrition

Les bactéries lactiques sont reconnues pour leurs bienfaits sur la santé et leur valeur nutritionnelle. Certaines souches possèdent des propriétés probiotiques et contribuent au maintien d'un microbiote intestinal équilibré, ce qui améliore la santé digestive. Elles peuvent également contribuer à réduire certaines infections gastro-intestinales et à atténuer l'intolérance au lactose (**Nikitina *et al.*, 2022**). De plus, les aliments fermentés avec des bactéries lactiques ont des propriétés hypocholestérolémiantes et antioxydants, et contribuent également à la santé cardiovasculaire, à la réduction de certaines réactions allergiques et à la régulation du système immunitaire (**García Burgos *et al.*, 2020**).

II.9.4 Domaine des aliments fonctionnels et boissons probiotiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la production de boissons probiotiques innovantes. Par exemple, les boissons au kéfir enrichies en jus de fruits ou en extraits de plantes contribuent à leurs propriétés antioxydantes et à l'amélioration de la santé intestinale (**Agirman *et al.*, 2024; Darvishzadeh *et al.*, 2021**). L'enrobage et le séchage par atomisation, méthodes modernes permettant d'améliorer la stabilité des cultures probiotiques et d'accroître leur durée de conservation dans ces boissons fermentées (**Marques Sotelino *et al.*, 2025**). Récemment, des technologies innovantes de fabrication de produits à base de kéfir, telles que l'impression 3D alimentaire, ont émergé (**Ok *et al.*, 2024**).

Matériel et méthodes

1. Objectif

Notre mémoire de master est considéré comme le premier résultat de nos séries d'expériences au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université d'Ain Témouchent. Le but principal de cette étude est d'isoler, de caractériser phénotypiquement des isolats de bactéries lactiques à partir de lait cru de vache provenant de deux régions (Ain Témouchent et Tlemcen). Nous avons ensuite essayé de tester la capacité de ces isolats lactiques à inhiber la croissance de quelques germes bactériens et fongique. Le choix d'utiliser les bactéries lactiques se justifie car de nombreux travaux scientifiques ont démontré l'efficacité de leur activité antagoniste vis-à-vis de nombreux microorganismes nuisibles. Cette étude a commencé par l'isolement, la purification et la caractérisation des isolats lactiques, ensuite l'étude de leurs propriétés antagonistes afin de les classer parmi le groupe des bio-protecteurs. Enfin, l'étude est achevée par un test d'antibiogramme, afin de tester la sensibilité des isolats lactiques vis-à-vis de quelques antibiotiques disponibles. Parmi les étapes suivies dans ce travail :

- Etude de la qualité sanitaire des échantillons de lait.
- Isolement des bactéries lactiques.
- Identification phénotypique des isolats lactiques et recherche de certaines caractéristiques biochimiques et physiologiques et enfin l'étude des propriétés antagonistes des isolats lactiques et le test d'antibiogramme.

2. Lieu et période d'étude

L'étude a été menée au laboratoire pédagogique de microbiologie du Département de Biologie, Faculté des Sciences et de la Technologie, à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaïb (UATBB), durant la période de mars à avril 2026.

3. Echantillonnage

3.1 Origine des échantillons

Deux échantillons de lait de vache ont été collectés dans différentes exploitations agricoles situés dans la région d'Ain Témouchent et de Tlemcen, dans des conditions aseptiques strictes afin de préserver leur qualité microbiologique. Les vaches étaient en bonne santé et n'avaient reçu aucun traitement antibiotique au moment du prélèvement. Par ailleurs, un seul échantillon de lactosérum de raïb a été utilisé aussi dans cette étude. Il a été obtenu à partir de lait fermenté de manière traditionnelle, puis récupéré sous forme de phase liquide séparée du caillé. Le tableau 7, présente les échantillons analysés.

Tableau 7 : Détails concernant les échantillons analysés

Code des échantillons	Type	Origine	Région	Date de prélèvement	Saison	Condition de transport
L1	Lait cru	vache	Tlemcen	03/03/2026	Printemps	Glacière (4°C)
L2	Lait cru	vache	Ain Témouchent	16/03/2026		
R1	Raïb (lactosérum)	Lait fermenté traditionnel	—			

3.2 Procédure de prélèvement et de transport

Le lait cru doit être manipulé avec un grand soin afin d'éviter tout risque de contamination pouvant influencer la flore lactique. Le prélèvement est réalisé en utilisant des gants stériles. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée du pis et séchage, les deux premiers jets sont éliminés, puis le lait est recueilli dans des flacons en verre stériles d'un volume de 250 mL. Les flacons refermés devront comporter tous les renseignements possibles (lieu, date et heure...) des prélèvements. Les échantillons sont ensuite conservés dans une glacière et acheminés immédiatement au laboratoire pour analyse (**Zergoug, 2017**).

Protocole expérimental

Le plan expérimental adopté est présenté par la figure 10.

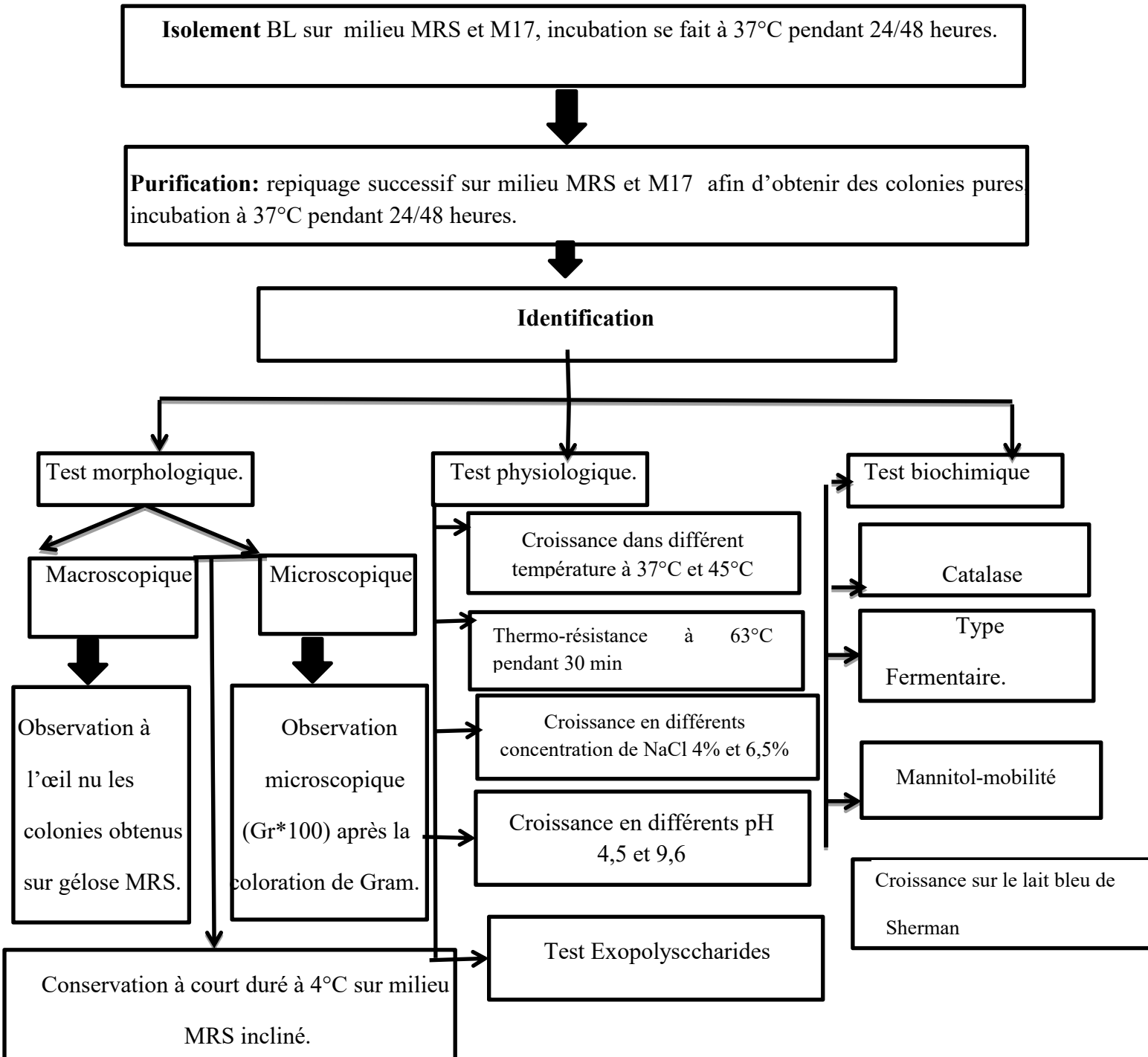


Figure 8 : Plan experimental.

4. Analyses physico-chimiques des échantillons de lait de vache

Nous avons effectué des analyses sur des échantillons de lait de vache, afin de déterminer leurs principales caractéristiques physico-chimiques. Les paramètres étudiés sont les suivants :

4.1. Mesure du pH

Ce test permet de nous renseigner sur la qualité des échantillons de lait. Le principe de ce test consiste à bien homogénéiser l'échantillon de lait, ensuite on mesure le pH à l'aide d'un pH-mètre étalonné en trempant l'électrode de l'appareil dans un bécher propre contenant un volume de 20 ml de lait prélevé à partir de l'échantillon initial.. La valeur du pH est lue directement sur l'écran de l'appareil. Pour garantir la fiabilité des résultats, on repère chaque mesure à trois reprises. Ensuite, on calcule la moyenne (AFNOR, 1986). La figure 11, illustre le pH-mètre utilisé pour la mesure des valeurs de pH des échantillons du lait cru.

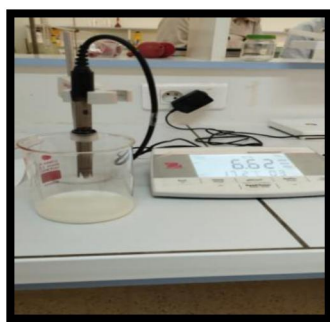


Figure 9 : Appareil de mesure du pH

4.2. Détermination de l'acidité titrable

Principe

L'acidité du lait est déterminée par titrage à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH N/9), en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. Le point d'équivalence est l'atteint lors de l'apparition d'une coloration rose persistante.

Mode opératoire

Un volume de 10 mL de lait à analyser est introduit dans un bécher propre, puis 3 à 5 gouttes de solution de phénolphthaléine sont ajoutées. Le mélange est ensuite titré par la solution de NaOH (N/9) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose stable (Katinancr *et al.*, 2012).

La figure 12, illustre le dispositif utilisé pour la détermination de l'acidité titrable.

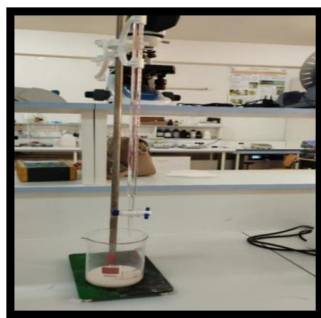


Figure 10 : Mesure de l'acidité titrable.

L'acidité du lait est exprimée en degré Dornic (°D), sachant qu'un degré Dornic correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$^{\circ}\text{D} = V(\text{NaOH}) \times 10$$

V(NaOH) : Représente le volume (en mL) de solution de soude utilisé pour titrer 10 mL de lait.

5. Analyse microbiologique

Les analyses bactériologiques du lait cru ont été effectuées au laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université d'Ain Témouchent. Ces analyses ont portées sur la recherche et le dénombrement de différents groupes de bactéries susceptibles d'être présentes dans les échantillons de lait cru, notamment la flore totale aérobie mésophile (FTAM), les coliformes totaux, les *staphylococcus aureus*, les levures et les moisissures et la recherche des bactéries lactiques présentes dans le lait. Les deux échantillons de lait de vache ont subi les mêmes analyses.

5.1 Etude la qualité sanitaire du lait de vache

Le lait peut être contaminé par divers microorganismes de l'environnement (ex. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Corynébactérium* ...). Des contaminations fécales peuvent également entraîner la présence de *Clostridium* et d'entérobactéries coliformes et éventuellement d'Entérobactéries pathogènes, telles que *Salmonella*, *Yersinia*... . Par ailleurs, les laits d'animaux malades peuvent enfin, contenir des germes pathogènes pour l'homme : *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (agents de mammites infectieuses chez la vache et pathogènes pour l'homme), *Brucella*, *Bacillus anthracis*, *Listeria*... . Ceci explique l'importance d'un contrôle sanitaire rigoureux.

5.1.1 Préparation des dilutions

En microbiologie, la dilution est un processus qui consiste à réduire la charge microbienne dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont réalisées en cascade jusqu'à la dilution 10^{-5} . Après homogénéisation de l'échantillon du lait (agitation pendant 10 secondes à l'aide d'un vortex). On prélève aseptiquement 1ml de l'échantillon de lait à l'aide d'une micropipette stérile, et l'introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, après homogénéisation, on transfère 1 ml de cette première dilution dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on effectue la même opération jusqu'au 5ème tube qui correspond à la dilution 10^{-5} . Chaque dilution a été homogénéisée à l'aide d'un vortex. La figure 11, présente la préparation de la série de dilutions décimale.



Figure 11 : Réalisation d'une série de dilutions.

5.1.2 Recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

La flore mésophile aérobie totale (FMAT) constitue un indicateur fiable du niveau de contamination microbiologique. Le dénombrement peut être effectué par un ensemencement de l'échantillon de lait en profondeur, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PCA gélosé (Plate Count Agar) (Guiraud, 1998) La composition de ce milieu est indiquée en annexe 1.

Mode opératoire :

Un volume de 1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) est prélevé de manière aseptique à l'aide d'une micropipette puis introduit dans des boîtes de Pétri vides stériles (ensemencement en masse). Ensuite, on coule environ 10 à 15 ml de gélose PCA en surfusion (44°C), le mélange est homogénéisé en effectuant des mouvements en forme de huit sur la paillasse, puis, le milieu est laissé se solidifier. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 72 h.

Lecture de résultats :

Le nombre de colonies a été dénombré et exprimé en unités formant colonies par millilitre d'échantillon (UFC/ml) (IPA, 2003).

5.1.3 Recherche des Staphylococcus

Les staphylocoques sont généralement considérés comme des germes saprophyte, soit de l'homme (*St. epidermidis*,...), soit des animaux (*St. intermedius* ...), soit de l'environnement (*St. xylosus*, *St. warneri*). Pour la recherche de Staphylocoque, un volume de 1 ml des deux dernières dilutions (10^{-4} , 10^{-5}) a été aseptiquement introduit dans des boîtes de Pétri stériles (ensemencement en masse). Ensuite, 10 à 15 ml de milieu de culture Chapman en surfusion (44°C) sont ajoutés, le milieu est homogénéisé par mouvement en huit puis laissé se solidifier. Après solidification, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 h. Le milieu Chapman est un milieu gélosé hypersalé à 75%. C'est un milieu de culture sélectif ne permettant la croissance que pour les germes halophiles (ex. Staphylocoque). La composition de ce milieu est indiquée en annexe 1.

5.1.4 Recherche coliforme totaux

Le protocole expérimentale consiste à prélever un volume de 1 ml à partir de chaque dilution (10^{-4} , 10^{-5}) puis l'introduire aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles. Ensuite, un volume d'environ 15 ml d'une gélose Désoxycholate (La composition de ce milieu est

indiquée en annexe 1) préalablement fondue et refroidie (44 °C), est ajouté dans chaque boîte. Le mélange est homogénéisé par agitation douce et lente afin d'assurer une répartition uniforme de l'inoculum dans le milieu (ensemencement en masse). Après solidification, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 heures. Après incubation, les colonies coliformes totaux ont été comptées.

5.1.5 Recherche sur les levures et les moisissures

Parmi les nombreuses espèces de levures et de moisissures, seules certaines espèces peuvent se maintenir dans le lait. L'usage du milieu Sabouraud (La composition de ce milieu est indiquée en annexe 2) est préconisé pour la culture, par ailleurs, l'isolement et l'identification des levures ainsi que les moisissures saprophytes ou pathogènes a été observé dans des échantillons faiblement chargés en bactéries (IPA, 2003).

Mode opératoire

La gélose Sabouraud est préalablement fondue puis coulée dans des boîtes de Pétri stériles et laissée se solidifier. Les tubes correspondants aux dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) sont ensuite homogénéisés par agitation douce. À l'aide d'une micropipette stérile, un volume de 0,1 mL (100 µL) est prélevé de chaque dilution puis déposé au centre de chaque boîte de Pétri. L'inoculum est ensuite étalé de manière aseptique à l'aide d'un étaloir (râteau) en L stérile, jusqu'à absorption complète par la gélose (ensemencement en surface). Les boîtes sont ensuite incubées à une température comprise entre 25 °C et 30 °C pendant une durée de 3 à 5 jours. Après incubation, la lecture de résultats a été réalisée par observations des colonies caractéristiques des levures et moisissures. La figure 14, présente les boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture utilisés.



Figure 12 : Boites de pétri contenant les différents milieux de culture utilisés.

5.2 Isolement et purification des bactéries lactiques

5.2.1 Isolement

Il s'agit d'une étude capitale, renfermant l'essentiel de notre partie pratique. L'objectif de cette étude bactériologique consiste à isoler des bactéries lactiques. En bactériologie, il est impérativement indispensable d'appliquer lors de manipulations de rigoureuses précautions d'asepsie.

Pour réaliser cette étude, des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été réalisées pour les deux échantillons de lait. Pour cela, on a effectué un ensemencement sur les milieux sélectifs MRS et M17 (dont la composition est indiquée en annexe 2 et annexe 3) seulement, avec les dilutions 10^{-4} et 10^{-5} , en utilisant la technique d'ensemencement en masse. Un volume de 1 ml de chaque dilution a été déposé dans des boîtes de Pétri stériles à l'aide d'une micropipette stérile, ensuite un volume de 15 ml de milieu MRS et/ou M17 maintenu en surfusion sont ajoutés. L'ensemble a été homogénéisé par un mouvement circulaire lent, puis laissée se solidifier. Parallèlement, un ensemencement en surface a été réalisé, en déposant un volume de 1 ml de chaque dilution à la surface d'un milieu solide MRS ou M17, puis l'étaler à l'aide d'un étaloir stérile. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 72h. Après l'incubation, ont été caractérisées les colonies observées sur MRS et M17 selon leur aspect morphologique (taille, forme, couleur...).

5.2.2 Purification isolats bactériens

Le but de cette opération est d'obtenir des colonies bactériennes nettement séparées. En microbiologie, une bactérie ne peut être identifiée qu'une fois isolée et obtenue à l'état pur. Pour cela, on a réalisé la purification des isolats afin d'obtenir des cultures pures. A partir des boîtes contenant des cultures précédemment incubées et à l'aide d'une anse de platine stérile et dans des conditions stériles, on prélève à partir d'une colonie isolée un inoculum, puis on le repique par technique d'ensemencement en strie sur les milieux gélosés MRS et M17. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. L'opération est effectuée plusieurs fois afin d'obtenir des colonies pures et homogènes, présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques confirmant ainsi la pureté des isolats.

5.3 Conservation des isolats

Après purification, les isolats de bactéries lactiques ont été conservés à 4°C, sur milieu gélosé MRS en tube incliné.

5.4 Identification des isolats

5.4.1 Caractères morphologiques

5.4.1.1 Examen macroscopique

Les méthodes d'étude et d'identification des bactéries sont multiples et se perfectionnent sans arrêt. Parmi ces méthodes, les techniques de culture des bactéries, les techniques d'observation macroscopiques et microscopiques, les techniques de coloration, les techniques biochimiques (tests traditionnels, Galerie API) et enfin les techniques de biologie moléculaire. Par ailleurs, la connaissance de la morphologie des bactéries et de l'aspect microscopique est à la base de l'identification bactérienne et constitue la première étape d'identification. Une colonie bactérienne est le résultat de la multiplication d'une bactérie à la surface d'un milieu de culture gélosé. Généralement, elle contient 10^{666} à 10^8 bactéries. Pour certaines espèces bactériennes, l'aspect définitif de la colonie est obtenu en 24 h, pour d'autres en deux ou trois jours. L'étude macroscopique des colonies bactériennes permet d'apprécier leurs nombreuses caractéristiques, qui, dans certains cas, orientent l'identification. On s'intéresse à : la forme, l'élévation, le contour, la taille, la couleur, l'opacité, la consistance et la surface de la colonie.

5.4.1.2 Examen microscopique

L'examen microscopique des bactéries est utilisé pour étudier certains détails de structures des cellules bactériennes (mobilité, forme et regroupement des cellules, type de Gram...). Parmi ces techniques, l'examen à l'état frais et les techniques de coloration. L'examen microscopique est effectué sur des frottis bactériens fixés et colorés ensuite observés au microscope optique.

Observation microscopique avec coloration de Gram

Coloration de Gram (1884)

Cette coloration double constitue un des premiers stades de l'étude microscopique d'une bactérie, en ce sens qu'elle permet un premier classement en bactéries dites Gram+ et Gram- (François *et al.*, 2011). Cette coloration permet aussi la mise en évidence de la forme des bactéries, soit rondes (coques) ou bâtonnets (bacilles) regroupées en amas, en chaînette ou en paires ; soit en spirale ou en hélice.

Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance appelée (la muréine), qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram (+) sont dépourvues. Cette paroi permet de classer les bactéries soit dans les Gram+ ou les Gram-. A la fin de la coloration, les bactéries dites Gram négatif apparaissent rose, tandis que les bactéries dites Gram positive sont colorées en bleu foncé / violet. Le principe de la technique consiste à préparer un frottis, soit à partir d'une solution bactérienne, soit à partir d'une culture sur milieu gélosé.

On dépose au centre d'une lame propre une faible quantité de culture bactérienne, prélevée à l'aide d'une anse stérile, et la délayer dans une goutte d'eau, en réalisant un étalement mince et homogène. On laisse sécher la lame à l'air libre sur la paillasse. Lorsque la préparation est nettement sèche, on procède à sa fixation, en tenant la lame nettement au-dessus du Bec Benzène, à une hauteur d'environ 30 cm. Répandre sur le frottis fixé 4 à 5 gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane, on laisse agir pendant une minute et on jette l'excès de violet en inclinant la lame, sans la laver. On recouvre la lame avec du Lugol, cette liqueur prend une teinte mordorée, on la jette au bout de quelques secondes et on répète l'opération avec une liqueur fraîche jusqu'à ce que la pellicule mordorée n'apparaisse pas. Le Lugol constitue le mordant. On décolore à l'alcool absolu goutte à goutte en inclinant la lame au-dessus de l'évier jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'actions décolorantes. La lame est lavée à l'eau du robinet ensuite recolorée à la fuchsine pendant une minute. La lame est lavée à l'eau puis séchée et examinée à l'immersion au microscope optique. Deux résultats sont possibles :

- Les bactéries G+ apparaissent en violet ; les bactéries Gram-, apparaissent en rouge.
- Même processus, mais on remplace le violet de gentiane par le cristal violet et la fuchsine par la safranine, les Gram+, apparaissent en violet foncé ; les Gram- apparaissent en rose. La figure 15, présente un exemple de résultat de la coloration de Gram.

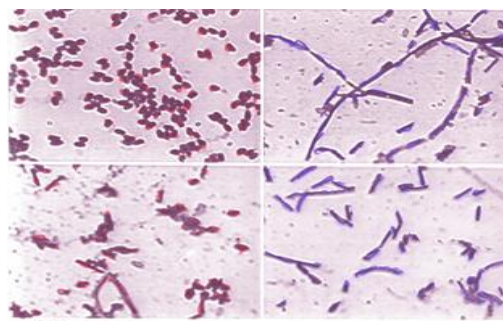


Figure 13 : Exemple de résultats de la coloration de gram.

5.4.2 Etude des caractères physiologiques et biochimiques

5.4.2.1 Recherche de la catalase

Le test de la catalase s'effectue sur les bactéries Gram positives, il sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à transformer l'eau oxygénée issue de la voie respiratoire oxydative directe en eau et en oxygène. La réaction ci-dessous illustre la présence de l'enzyme catalase :



Le principe de la technique consiste à déposer à l'aide d'une pipette pasteur stérile une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre, puis on prélève une faible quantité de la culture à examiner et la dissocie dans la goutte d'eau oxygénée. Si la bactérie possède une catalase, on observe un dégagement gazeux (petites bulles), l'absence des bulles témoignent d'une catalase-.

5.4.2.2 Type fermentaire

Les bactéries lactiques pendant leur croissance dégradent les sucres contenus dans le milieu de culture en empruntant soit la voie homofermentaire, dont le produit final est essentiellement l'acide lactique ou hétérofermentaire en produisant en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂. Les bactéries homofermentaires ne produisent pas de gaz contrairement aux bactéries hétérofermentaires qui produisent du CO₂ dans le milieu. Donc, Ce test permet la distinction entre les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires.

Des cultures jeunes de bactéries lactiques (L1, L2, L3, L4, R1) sont cultivées dans des tubes contenant le bouillon MRS, pourvu d'une cloche de Durham. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C, pendant 24 h. Après incubation, la production de gaz (CO₂= apparition de bulles) dans la cloche traduit le développement de bactéries hétérofermentaires, tandis que son absence caractérise les bactéries homofermentaires.

5.4.2.3 Milieu Mannitol-mobilité

Ce milieu est une gélose molle contenant du mannitol et un indicateur coloré de pH, le rouge phénol. Il permet d'apprécier :

- la fermentation du mannitol par virage du milieu au jaune et la mobilité de la bactérie. Les germes mobiles diffusent à partir de strie centrale d'ensemencement et se développent sur l'ensemble du milieu. Tandis que le germe immobile se cultive uniquement le long de la strie.

Le mannitol est un produit de réduction du mannose. La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation du fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (**Guillaume.2004**). A l'aide d'une anse stérile, des isolats lactiques sont ensemencés sur milieu mannitol mobilité par pique centrale jusqu'au fond du milieu. Les tubes sont incubés à 37 °C, pendant 24. Après incubation, le résultat du test est évalué selon les données précédemment cités.

5.4.2.4 Croissance à différentes températures

Selon le genre et les espèces bactériennes, la température optimale de croissance varie. On divise les bactéries en trois groupes selon cette température : bactéries psychrotrophes, bactéries mésophiles et bactéries thermotrophes. Ce test permet donc de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries thermophiles. (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

Principe

Cinq isolas lactiques sont ensemencés à l'aide d'une anse stérile sur bouillon MRS en tube à essai. Les tubes ensemencés sont ensuite incubés séparément à deux températures : 37°C et 45°C pendant 24. Après incubation, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans le milieu de culture.

5.4.2.5 Croissance à différentes concentrations de NaCl

Ce test joue un rôle important dans l'identification des bactéries (**Badis et al., 2005**). Il permet de savoir si les bactéries lactiques sont capables de croître dans un milieu salé. Les isolas lactiques sont ensemencées dans un bouillon MRS salé à concentrations 4% et 6.5% de Na Cl. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, la capacité des isolats à croître dans ces milieux est appréciée par une simple croissance (présence d'un trouble dans le milieu).

5.4.2.6 Croissance à différents pH

Les bactéries se multiplient bien à pH neutre ou légèrement alcalin. Elles ne supportent pas les pH acides sauf exception : les bactéries acidophiles, les levures et les moisissures. Le principe de ce test consiste à ensemer les isolats lactiques dans un milieu MRS liquide

ajustés à pH 4.5 et 9.6. Les tubesensemencés sont incubés à 37 °C, pendant 48 h. Après incubation, l'apparition d'un trouble est un élément clé de la croissance bactérienne.

5.4.2.7 Test thermorésistance

Ce test permet de connaître si les bactéries lactiques sont capables de résister à un traitement thermique. Le principe de ce test consiste à effectuer un traitement thermique des isolats lactiquesensemencés dans du bouillon MRS en tube, maintenus dans un bain marie à 63°C pendant 30 min, puis incubés à 37°C pendant 24h. Les bactéries présentant une croissance (un trouble) sont considérées comme des thermorésistantes.

5.4.2.8 Test Exopolysccharides (EPS)

Le principe de ce test est d'expérimenter la production des EPS sur un milieu hypersaccharosé. Les isolats lactiques sontensemencés à l'aide d'une anse stérile en stries sur milieu gélosé MRS. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, la production des exopolysaccharides se manifestent par la formation de colonies larges et gluantes et très visqueuses.

5.4.2.9 Croissance sur le lait bleu de Sherman

Ce test permet de mettre en évidence le développement des bactéries lactiques en présence du bleu de méthylène, dont, la coloration est bleue en conditions oxydantes et incolore en milieu réduit. Il permet aussi de différencier entre les genres *Streptococcus* et les *Lactococcus*. Les isolats lactiques sontensemencés dans du lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3% (tube contenant 9 ml de lait écrémé additionné de 1ml de bleu de méthylène 0.1% et 0.3%). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 h à 48 h. Après incubation, on note les observations relatives à la réduction du bleu de méthylène. (La composition de ce milieu est indiquée en annexe 4)

5.5 Test de résistance aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques a représenté un des moments cruciaux dans le développement de la médecine moderne qui ne pourrait même pas être conçu sans l'existence des antibiotiques. Le rôle actuel dans la thérapeutique des infections est sans doute primordial, toutefois il faut souligner que les antibiotiques actuels sont actifs seulement à l'égard des infections provoquées par des bactéries, tandis que les infections virales bénéficient très rarement d'une antibiothérapie. Même dans le cas des bactérioses, les antibiotiques s'avèrent

efficaces seulement à condition que la souche bactérienne soit sensible, que la dose soit adéquate et que le traitement ait une durée suffisamment prolongée. L'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques peut s'avérer non seulement inutile et inefficace, mais aussi dangereuse par la sélection des bactéries résistantes. La variation naturelle (mutation) de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques, ainsi que l'existence des souches résistantes nous oblige à isoler le germe pathogène et à déterminer sa sensibilité aux antibiotiques avant d'établir toute antibiothérapie.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques d'une bactérie est connue sous le nom d'antibiogramme. L'antibiogramme constitue donc un moyen pour apprécier la sensibilité d'une bactérie à l'égard des taux thérapeutiques d'un antibiotique (**Jahl *et al.*, 2015**).

On connaît deux types de méthodes pour effectuer un antibiogramme.

-Méthodes de dilution en milieu liquide ou solide,

- Méthodes diffusimétriques (méthode à disques multiples : plusieurs disques imprégnés avec des quantités différentes de chaque antibiotique (U.I). L'évaluation de la sensibilité d'une souche est simplement indiquée par la présence d'une zone d'inhibition en tenant compte du diamètre de la zone.

Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide, car cette méthode est plus facile à réaliser que la précédente ; elle est aussi mieux adaptée aux techniques de laboratoire.

Le principe de la technique consiste les souches (L2; L3; L4) ont été cultivées dans du bouillon MRS à 37°C pendant 24 heures. La densité bactérienne a ensuite été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre à 600 nm de 0,08 à 0,1 (0.5 McFarland). Des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé MRS, ensuiteensemencées par les isolats dont on veut étudier la sensibilité par la technique d'écouvillonnage, en réalisant des stries serrées. Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface du milieu MRS. Quatre disques sont déposés par boîte. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h, dans une étuve réglée à 37 °C, couvercle en bas. L'antibiotique contenu dans le disque diffuse dans le milieu. La concentration de l'antibiotique diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque. La lecture des résultats est effectuée selon le diamètre de la zone

d'inhibition, les bactéries sont classées dans les catégories : sensibles, intermédiaires ou résistantes.

Sensible (S) : La bactérie est inhibée par l'antibiotique,

Intermédiaire (I) : La bactérie est sensible à l'antibiotique testé mais à une concentration élevée.

Résistante (R) : L'antibiotique testé est sans effet sur la bactérie (**Zoutat et Saad, 2019**). la figure 16, illustre un exemple de résultats d'antibiogramme. Il est à signaler que les antibiotiques ont deux modes d'action :

Action bactériostatique : La croissance s'arrête mais les bactéries ne sont pas tuées.

Action bactéricide : les bactéries sont tuées.

Selon la disponibilité des antibiotiques, dix antibiotiques ont fait l'objet de notre étude. Le tableau 08, présente les antibiotiques utilisés.

Tableau 8 : La liste des antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Code
Rifampicine 30µg	RD30
Amoxicilline 30µg	AML30
Tétracycline 30µg	TE 30
Vancomycine 5µg	VA5
Acide nalidixique 30µg	NA30
Ampicilline 10µg	AMP10
Kanamycine 10µg	CN10
Oxacilline 5µg	OX5
Rifampicine 5µg	RD5
Gentamicine 50µg	GEN50

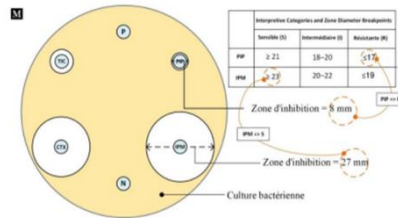


Figure 14 : Résultats d'un antibiogramme (Ket, 2016).

5.6 Étude de l'activité antimicrobienne des isolats lactiques

Selon la littérature, l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques est connue depuis des siècles lors de leur utilisation en tant que ferments lactiques au niveau des industries alimentaires et agroalimentaires et laitières. Cependant, il s'est avéré que ses ferments ont tendances à minimiser les risques des pathologies intestinales telles que les entérocolites à *Escherichia coli* et autres germes microbiens et à contribuer à la conservation des aliments. Cette partie de notre étude est consacrée à l'étude de l'activité inhibitrice des isolats de bactéries lactiques vis-à-vis de trois germes microbiens (souches considérées comme indicatrices ou sensibles). Cette étude est réalisée selon deux méthodes :

Souches indicatrices

Nous avons utilisé trois souches indicatrices, il s'agit de : *Echerichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Candida albicans* ATCC 10231. Les souches nous ont été aimablement fournies par les étudiants de la même promotion, ces dernières ont fait l'objet d'une étude sur les souches de bactéries lactiques présentant un effet probiotique.

5.6.1 Méthode de double couche (méthode de Fleming *et al.*, 1975)

Cette méthode permet de mettre en évidence l'action inhibitrice des isolats lactiques par contact cellulaire. Des cultures jeunes de 24 h d'isolats lactiques, L1 et L4, supposés être inhibitrices sont ensemencées en spots (touches) dans des boîtes de Pétri contenant un milieu solide MRS. Les boîtes sont laissées sécher à température ambiante pendant une à deux heures, puis mises à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, un mélange contenant environ 8 ml de gélose molle en surfusion et à concentration 0,7 % et 0,1 ml d'une suspension de culture liquide de la souche supposée indicatrice, *Staphylococcus aureus*

ATCC 6538 est préparé. Après homogénéisation, le mélange est ensemencé à la surface des boîtes pré-incubées conformément à la méthode de double couche. Après solidification du milieu, les boîtes sont incubées à 37°C, pendant 24 heures. L'inhibition se manifeste par l'apparition d'une zone transparente autour des isolats ensemencés en spots. Après incubation, la lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre des zones d'inhibitions apparues autour des isolats ensemencés en touches. Ces diamètres sont mesurés à l'aide d'une règle et sont calculés en millimètre.

5.6.2 Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de l'isolat lactique producteur des substances antimicrobiennes avec la souche indicatrice dans un milieu solide. Le principe de la technique consiste à ensemencer les isolats lactiques (L2, L3, L4 et R1) dans des tubes contenant un milieu liquide MRS. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 heures. Après incubation, les cultures sont soumises à une centrifugation à 6 000 rpm/10 minutes afin de séparer le culot du surnageant et récupérer ce dernier. Le surnageant stérile est obtenu après filtration du surnageant à travers des filtres millipores stériles de 0,22 µm de diamètre. Ensuite des boîtes de Pétri contenant le milieu gélose Mueller-Hinton(MH) (La composition de ce milieu est indiquée en annexe 3) sont ensemencées en masse à l'aide d'un écouvillon stérile par les cultures supposées être sensibles (indicatrices) : *E.coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6538. Après solidification de ce milieu, et dans des conditions stériles, des puits d'environ 5 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on introduit ensuite dans chaque puits environ 100 µl de surnageant stérile. Les boîtes sont mises en incubation à 37°C, pendant 24 à 48 h. Après incubation, l'activité antibactérienne est évaluée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions autour des puits.

5.6.3 Activité microbienne vis-à-vis de *Candida albicans*

L'activité antimicrobienne des isolats lactiques (R1, L3 et L4) a été évaluée selon la méthode de diffusion en puits réalisés sur gélose Muller Hinton. Le principe de la méthode consiste à ensemencer en surface et à l'aide d'un écouvillon stérile un milieu gélosé Muller Hinton une suspension fongique de *Candida albicans* ATCC 10231. Après solidification, du milieu, des puits d'environ 5 mm de diamètre ont été effectués dans des conditions aseptiques à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Ensuite, dans chaque puits sont introduits environ 100µL de surnageant stériles des bactéries lactiques (R1, L3, L4). Les boîtes sont incubées à 37°C

pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne est déterminée par la mesure des zones d'inhibition autour des puits.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Dans cette partie, ont été exposés les résultats que nous avons obtenus dans notre étude expérimentale. On a commencé par les analyses physico-chimiques, notamment le pH et l'acidité Dornic, afin de caractériser l'échantillon de lait analysé.

1. Résultats des analyses physico-chimiques

1.1 Résultats du pH

Le pH du lait et des produits laitiers est un paramètre important lorsqu'il s'agit de contrôler la qualité du lait. Le pH du lait de vache, situé entre 6,6 et 6,8 (légèrement acide à neutre), joue un rôle fondamental dans la stabilité, la qualité et la transformation du lait. Il est le garant de l'équilibre physico-chimique et bactériologique du produit. Les valeurs moyennes du pH des deux échantillons de lait sont présentées dans le tableau 09. Ces valeurs montrent que les deux échantillons présentent un pH proche de la neutralité, avec des valeurs de : 6,4 et 6,6. Les résultats obtenus montrent que le pH des échantillons constitue un milieu favorable pour le développement des bactéries et sont conformes aux valeurs normales du lait cru frais. Nos résultats et en parfaite accord, avec ceux rapportés par **Walstra *et al.*, (2006)**. Certaines études ont également rapporté des valeurs légèrement différentes. Selon **Alais (1984)** une diminution du pH peut être liée à l'activité des bactéries lactiques produisant de l'acide lactique lors de la conservation du lait.

1.2 Résultats de l'acidité Dornic

L'acidité Dornic (exprimée en °D) mesure la quantité d'acide lactique dans le lait (1 °D = 0,1 g d'acide par litre). Son rôle est d'évaluer la fraîcheur du lait et de contrôler son aptitude à la transformation (fromage, yaourt), le lait frais devant titrer entre 14 °D et 18 °D.

L'acidité Dornic est un paramètre d'une très grande importance qui conditionne le démarrage des manifestations microbiologiques. Il reflète les conditions de stockage des échantillons de lait et nous permet de connaître la qualité du lait analysé. Les valeurs de l'acidité Dornic obtenus pour les deux échantillons sont respectivement, 16 et 18,5. Les résultats des analyses physico-chimiques sont présentés dans le tableau 10. D'après les résultats l'échantillon 2 de lait de vache révèle une valeur plus ou moins importante par rapport au premier échantillon. À la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que les échantillons de lait présentent des valeurs de pH et d'acidité très proches de la norme. Les résultats de l'acidité Dornic ont montré une disparité entre l'échantillon 1 (16°D) et

l'échantillon 2 (18,5°D). La valeur de l'échantillon 1, est conforme aux normes du lait cru frais, cette valeur d'acidité se rapproche des valeurs trouvées par **Colinet *et al.*, (2010)** et **Troch *et al.*, (2017)**. En revanche, l'échantillon 2 présente une acidité légèrement supérieure à la valeur normale maximale, elle est de 18°C. Selon certains auteurs, cette augmentation peut être liée à une charge microbienne plus ou moins élevée ou à des conditions de stockage moins favorables. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Guirad (2003)**, qui a rapporté que l'augmentation de l'acidité du lait est due généralement au développement des bactéries lactiques capables de transformer le lactose en acide lactique.

Les valeurs du pH et de l'acidité Dornic sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 9 : Résultats des analyses physico – chimiques.

Echantillons	pH	Acidité Dornic
Lait 1	6,6	16 °D
Lait 2	6,4	18,5°D
Les normes	Entre 6,4 et 6,8	Entre 15°D et 18°D

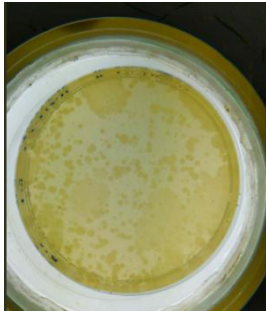
2. Résultats de l'étude la qualité sanitaire des échantillons de lait de vache

Au cours de cette étude, quatre paramètres microbiologiques ont fait l'objet d'étude, notamment la flore totale aérobie mésophile (FTAM), les coliformes totaux, la présence de *Staphylococcus aureus* ainsi que la présence ou non des levures et moisissures. Les résultats de ces analyses sont exprimés en UFC/mL.

2.1 Résultats de la flore mésophile aérobie totale (FTAM)

Après incubation, un dénombrement de la flore mésophile aérobie totale a été réalisé. Les deux échantillons de lait présentent différentes colonies bactériennes de taille variée généralement, soit des colonies petites ou grandes avec des couleurs différentes (jaunes ou blanches). Les colonies présentent généralement une forme circulaire avec une surface lisse. Les boîtes contenant un nombre variant entre 30 et 300 ont été prises en considération. Le calcul des UFC a été effectué selon la formule suivante : $\text{UFC/mL} = \text{Nombre de colonie} / \text{volume ensemencé} \times (1/ \text{dilution})$. Les Figures 17 et 18 présentent les colonies de la flore mésophile aérobie totale des deux échantillons.

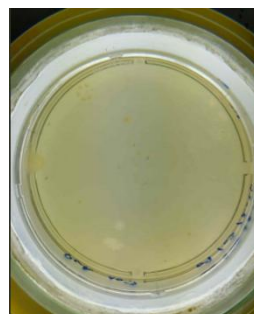
Echantillon 1 : $N = 180$; $V = 1\text{mL}$; $d = 10$; $N = 180 \times 10$; $N = 1,8 \times 10^4 \text{UFC/mL}$



$10^{-1} : +300$



$10^{-2} : 180$



$10^{-3} : 20$



$10^{-4} : 7$

Figure 15 : Nombre de colonies de la flore mésophile aérobie totale et aspect macroscopique (FMAT) sur milieu PCA (échantillon de lait 1).

Echantillon 2 : $N = 130$; $V = 1\text{mL}$; $d = 10$; $N = 130 \times 10$; $N = 1,3 \times 10^4 \text{UFC/mL}$



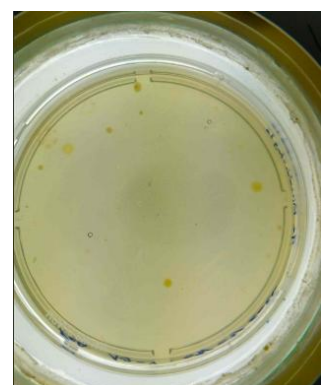
$10^{-1} : +300$



$10^{-2} : 130$



$10^{-3} : 17$



$10^{-4} : 9$

Figure 16 : Nombre de colonies de la flore mésophile aérobie totale et aspect macroscopique (FMAT) sur milieu PCA (échantillon de lait 2).

La flore mésophile aérobie totale (FMAT) a été évaluée à $1,8 \times 10^4 \text{UFC/mL}$ dans l'échantillon de lait 1 (Tlemcen) et $1,3 \times 10^4 \text{UFC/mL}$ dans l'échantillon de lait 2 (Ain Témouchent). Cette charge microbienne modérée, témoigne d'une bonne pratique d'hygiène.

Ces valeurs restent inférieures à la limite réglementaire fixée à 10^5UFC/mL , selon le Journal Officiel de la République Algérienne (**JORA n°35, 1998**). Ces valeurs nous laissent supposer d'une qualité microbiologique globalement acceptable des échantillons analysés. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Baazize-Amami et al., (2023)**, qui ont montré que les

lait cru respectant les bonnes pratiques d'hygiène présentent généralement une flore mésophile conforme aux normes algériennes. **Benyoub *et al.*,(2019)**, ont souligné qu'une faible charge en flore mésophile aérobie totale est liée au respect des bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite et au nettoyage correct du matériel de collecte permettent de limiter la prolifération microbienne.

2.2 Résultats de la recherche des Coliformes totaux

Après incubation à 37°C pendant 48 heures sur milieu Désoxycholate. aucune croissance bactérienne n'a été observée dans les boîtes de Pétri ensemencées par l'échantillon 1. En revanche, on a constaté des colonies de petite taille, de couleur rose à rouge, de forme circulaire à bord régulier dans les boîtes contenant l'échantillon 2. La figure 18, présente les colonies correspondantes aux coliformes totaux. La figure 18 (B), présente les colonies coliformes.

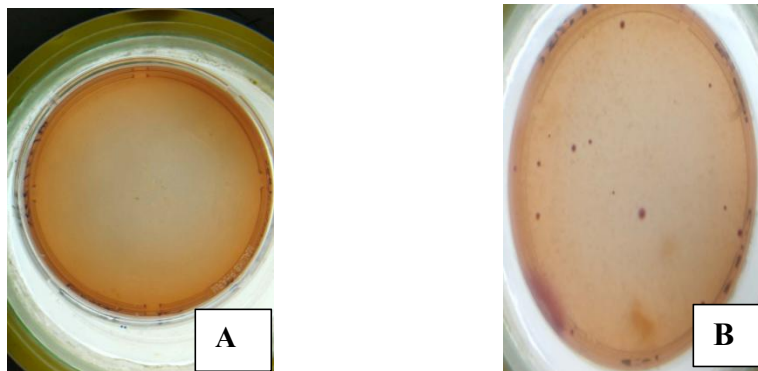


Figure 17 : Aspect des coliformes totaux sur gélose Désoxycholate ; **A** : Echantillon de lait 1 présentant une absence de croissance ; **B** : Echantillon de lait 2 présentant des colonies de coliformes.

Les résultats obtenus concernant les coliformes totaux montrent une absence de germes dans l'échantillon 1 (Tlemcen), tandis que l'échantillon de lait 2 (Ain Témouchent) présente une charge avoisinant $1,4 \times 10^3$ UFC/mL. Ces valeurs restent globalement inférieures ou proches du seuil réglementaire fixé à 10^3 UFC/mL selon le Journal Officiel de la République Algérienne (**JORA n°35, 1998**). Ces valeurs témoignent d'une qualité microbiologique relativement acceptable. L'absence de coliformes dans l'échantillon 1 suggère de bonnes conditions d'hygiène lors de la traite et une conservation bien maîtrisée du lait. En revanche, la présence de coliformes dans l'échantillon 2 serait probablement due au manque d'hygiène

de litières et à l'état de l'animal. Certaines études rappellent que la présence de coliformes est souvent liée à une contamination fécale ou environnementale.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Magnusson *et al.*, (2007)** qui ont montré que les animaux mal entretenus sont susceptibles de transmettre des coliformes dans le lait, avec un risque plus élevé de mammites. D'autres facteurs peuvent aussi contribuer à cette contamination, à savoir les mauvaises conditions de transport du lait et un manque d'hygiène lors de la traite.

2.3 Résultats de la recherche de *Staphylococcus*

Après incubation, les résultats de la recherche de *Staphylococcus* sur le milieu Chapman à dilution 10, ont montré une absence de croissance dans les boîtesensemencées par l'échantillon 1. A l'inverse, les boîtes de l'échantillon de 2 ont dévoilé la présence d'une seule colonie isolée entourée d'un halo jaune. On peut donc, supposer que ces caractéristiques correspondent à *Staphylococcus*. La figure 18 (B), présente la colonie précédemment citée.

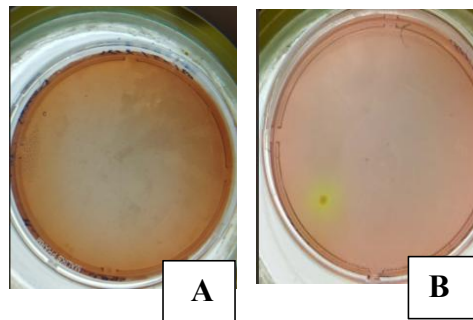


Figure 18 : Aspect macroscopique du milieu Chapman ; **A:** Echantillon 1 présente une absence de croissance **B :** Echantillon 2 présente une croissance d'une seule colonie.

Afin de confirmer l'identité de la colonie isolée de l'échantillon 2 sur milieu Chapman, on a effectué une coloration de Gram et le test catalase.

- Après coloration, l'observation microscopique a permis d'observer des cellules de forme Cocci regroupés en amas et colorées en violet (Gram+).
- Le test catalase effectué par dépôt de quelques cellules dans une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dégagement de bulles confirme que la souche est catalase positive. La figure 21, présente les résultats de la recherche de *Staphylococcus*. Le tableau 10, présente les résultats de la qualité sanitaire des échantillons de lait.

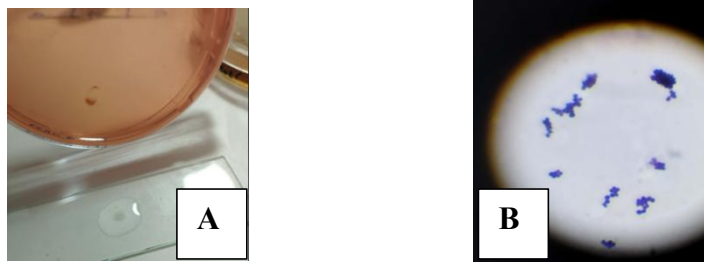


Figure 19 : Test d'orientation ; **A :** résultat du test de la catalase ; **B :** Observation microscopique après la coloration de Gram (Gr X 100).

L'absence de coliformes totaux et de Staphylocoques dans nos échantillons est un indicateur positif de la qualité sanitaire dans l'échantillon 1. En revanche, l'échantillon 2 (Ain Témouchent) présente une charge plus ou moins élevée avoisinant 1×10^4 UFC/mL. Cette valeur dépasse le seuil de la limite réglementaire fixée à 10^2 UFC/mL (Journal Officiel de la République Algérienne (**JORA n°35, 1998**)). Ce résultat positif semble être directement lié aux mauvaises pratiques durant la traite mais aussi à une contamination du matériel ainsi qu'aux mammites bovines. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Ahmed et al., (2024)**, qui ont rapporté une présence de Staphylocoques dans le lait cru.

Plusieurs études ont montré que les exploitations présentant une hygiène insuffisante enregistrent des charges microbiennes importantes similaires aux résultats obtenus dans notre étude. De même, **Deddefo et al., (2024)** ont observé une présence de Staphylocoques dans le lait et les produits laitiers issus d'exploitations où les conditions sanitaires étaient insuffisantes. Selon certains auteurs, cette contamination semble être liée à une absence de désinfection des trayons et le non-respect des bonnes pratiques de conservation du lait cru. Enfin, l'absence de Staphylocoques dans l'échantillon 1 pourrait être expliquée par les meilleures conditions d'hygiène durant la traite, un bon état sanitaire de l'animal et une conservation adéquate du lait après la collecte.

Tableau 10 : Résultats des études de la qualité sanitaire des deux laits

Germe	Lait 1 (Tlemcen)	Lait 2 (Ain Temouchent)	Norme J.O.A UFC/mL
FMAT	$1,8 \times 10^4$ UFC/mL	$1,3 \times 10^4$ UFC/mL	$\leq 10^5$ UFC/mL
les Coliformes totaux	Absent	$1,4 \times 10^3$ UFC/mL	$\leq 10^3$ UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absent	1×10^4 UFC/mL	$\leq 10^2$ UFC/mL ou Absence

2.4 Résultats de la recherche des levures et des moisissures

Après incubation, aucune croissance de micro-organismes fongiques n'a été constaté dans les boîtes de l'échantillon 1 (dilution 10^{-3}). Par contre, une colonie fongique a été constatée dans une boîte correspondant à l'échantillon 2. Cette colonie fongique présente une croissance radiale et régulière, veloutée à poudreuse de couleur verte sombre à noirâtre. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de cette dernière n'ont pas permis de l'identifier.



Figure 20 : Aspect macroscopique de la croissance fongique sur milieu Sabouraud . **A** : Absence de croissance pour l'échantillon 1. **B**: présence d'une colonie fongique dans l'échantillon 2.

La recherche des levures et des moisissures ont montré une absence de ces microorganismes dans l'échantillon 1 (Tlemcen), en revanche, l'échantillon 2 (Ain Temouchent) a montré une croissance d'une colonie fongique, dont les caractéristiques macroscopiques et microscopiques n'ont pas permis de l'identifier. L'absence d'une croissance fongique dans l'échantillon 1 (Tlemcen) traduit une bonne qualité microbiologique du lait et une faible contamination par les micro-organismes fongiques. Ce résultat suggère que les conditions de production, de manipulation et de conservation du lait étaient satisfaisantes. En effet, la littérature scientifique indique que la charge fongique du lait cru reste très faible et dépend des conditions de la traite et du matériel utilisé. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Lavoie et al., (2012)** qui ont montré la présence de certaines espèces de moisissures. Cette présence est probablement due à une contamination environnementale au cours de la traite. Ces mêmes auteurs ont également rapporté que les genres les plus fréquemment isolés sont : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. De même, **Lima et al., (2020)** ont rapporté que la présence des moisissures dans le lait cru est un indicateur de défaut d'hygiène et de mauvaises conditions de stockage. Ces auteurs expliquent que les champignons filamenteux se développent facilement lorsque le lait est exposé à un environnement humide et mal contrôlé.

3. Résultats de l'isolement des isolats lactiques

Après les différentes étapes d'isolement, d'enrichissement et de purification, cinq isolats ont été obtenus à partir de deux échantillons de lait de vache provenant des régions d'Ain Témouchent et de Tlemcen et un échantillon de lait fermenté (Raïb). Les isolats ont été isolés sur milieux sélectifs, dont trois isolats sur milieu M17 et deux sur milieu MRS. Le tableau 11, présente les résultats de l'isolement.

Tableau 11 : Les codes des isolats lactiques isolés.

Echantillon	Milieu de culture	isolats
Lait1 (Tlemcen)	M17	L1,L2
Lait2 (Ain Temouchent)	M17 et MRS	L3,L4
Raïb	MRS	R1

4. Résultats des caractères morphologiques des isolats lactiques

4.1 Examen macroscopique

A l'issu des isolements partir des échantillons de lait, cinq isolats de bactéries lactiques ont été obtenus sur milieu M17 gélosé. Les colonies sont de petite taille, de forme circulaire avec des bords lisses et des contours réguliers. Elles présentent une couleur blanchâtre à crème avec une surface lisse et brillante. Les colonies obtenues sur milieu MRS gélosé, sont punctiformes nettement isolées, de forme circulaire et de couleur blanchâtre, présentant une texture lisse. A l'issu de ces résultats, très peu de colonies bactériennes ont été isolées. La raison pour laquelle, on a inclus le troisième échantillon (Raib). Le tableau 11, présente les codes des isolats, alors que la figure 21, illustre les colonies bactériennes isolées sur les deux milieux de culture.

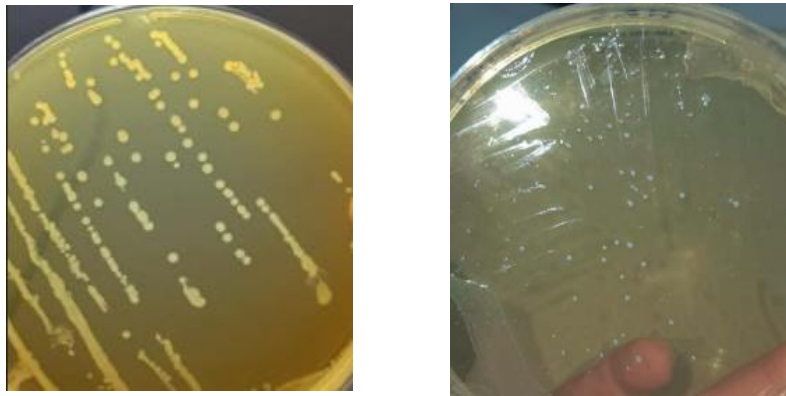


Figure 21 : Résultats de l'isolement des germes lactiques sur milieu MRS et M17.

4.2 Purification des isolats

Après le repiquage par la méthode de strie sur milieu MRS et M17 on a obtenu des colonies isolées homogènes présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques. La figure 22, présente la purification des isolats.



Figure 22 : Purification des isolats lactiques L2 (M17) et L4 (MRS).

4.3 Identification des isolats

L'examen macroscopique des cinq isolats purifiés et pré-identifiés sur la base de leur couleur blanchâtre, lisses, à contour régulier et d'une taille plus ou moins identique ont été retenus pour l'examen microscopique.

4.3.1 Examen microscopique

A l'issue de l'examen microscopique et après coloration de Gram, l'observation au microscope optique (Gr x 100) a permis d'observer la présence de bactéries à coloration Gram positive présentant différentes morphologies. Ces bactéries se présentent sous forme de Cocci disposées en paires (diplocoques), en amas ou en chaînettes, ainsi que sous forme de bâtonnets longs et courts. Les cinq isolats présumés être des souches lactiques, ont été retenus pour la suite de notre travail. La figure 23, illustre l'aspect microscopique des isolats lactiques.

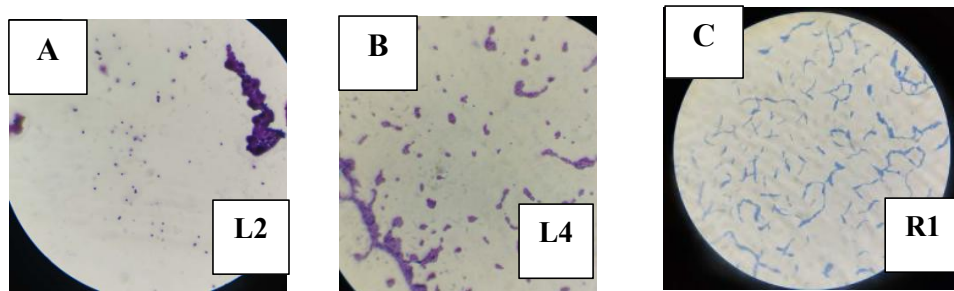


Figure 23 : Aspect microscopique des isolats L2, L4 et R1 (GrX100). **A:** Cocci isolées ou diplocoques ; **B:** Bacilles courts ; **C:** Bacilles longs.

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélé des différences morphologiques entre les isolats, ce qui reflète une diversité de la flore lactique présente dans le lait de vache cru. Les cinq isolats se sont tous révélés des Gram positif, due à la présence d'une paroi cellulaire riche en peptidoglycane. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Whittenbury 1964), (Guiraud J.P., 2003) et Carmen Collado et Hernández (2007).

5. Résultats des caractères biochimiques

5.1 Résultat du test catalase

Les isolats étudiés présentent une réaction négative au test catalase, caractérisé par l'absence de dégagement de bulles après l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une catalase négative ne possède pas d'enzyme en raison de leur métabolisme fermentaire, est le signe très probable des germes lactiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de **(Whittenbury 1964)**, **(Guiraud J.P., 2003)** et **Carmen Collado et Hernández (2007)**.

D'ailleurs, la coloration de Gram et le test de la recherche de l'enzyme catalase sont considérés des marqueurs fiables et discriminants pour l'identification préliminaire des bactéries lactiques. Catalase négative ne possède pas d'enzyme en raison de leur métabolisme fermentaire.

5.2 Résultats du type fermentaire

Après test de pré-identification, les isolats ont subi le test de dégagement de CO_2 à partir du glucose. Les résultats ont montré que les cinq isolats lactiques étudiés sont révélés des homofermentaires. La figure 24, présente les résultats du type fermentaire.



Figure 24 : Résultats du test de type fermentaire.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Hammes et Vogel (1995)**, qui ont montré que plusieurs espèces de bactéries lactiques associées aux produits laitiers appartiennent au groupe des bactéries homofermentaires. Les souches homofermentaires produisent l'acide lactique seulement par contre les souches hétérofermentaires produisent l'acide lactique et le CO_2 **(Carr et al., 2002)**.

5.3 Résultats du test Mannitol-Mobilité

Le test Mannitol-Mobilité a permis de montrer que les cinq isolats lactiques sont des germes immobiles, alors que le test de la fermentation du mannitol a montré que quatre isolats ont présenté une réaction positive caractérisée par un changement du couleur du milieu du rouge vers le jaune avec un virement du pH, tandis qu'un seul isolat (L4) a montré une réaction négative. La figure 25, présente les résultats du test Mannitol-mobilité.

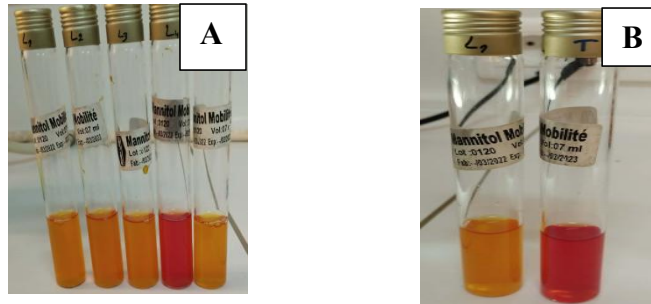


Figure 25 : A: Résultats du test Mannitol-mobilité ; **B:** isolats L1 par rapport témoin

Le test de mannitol mobilité a révélé deux caractéristiques des isolats étudiés l'absence de mobilité pour tous les isolats (L1, L2, L3, L4 et R1) confirmant ainsi la nature non flagellée de ces bactéries lactiques. De même, la majorité de nos isolats (L1, L2, L3 et R1) sont mannitol-positifs (virage au jaune), témoignant d'une fermentation du mannitol. A l'inverse, la réaction négative de l'isolat L4 témoigne d'une absence de voies enzymatiques. Cette hétérogénéité biochimique concorde avec les observations de **Soleha et al.,(2024)**, cela suppose que l'isolat L4 appartient à un genre et à une espèce différente.

5.4. Résultats de la croissance sur lait de Sherman

Le test de la croissance sur lait de Sherman a permis de répartir les isolats en deux groupes, le premier groupe rassemblant trois isolats (L2, L4 et R1) ont coagulé le lait et ont réduit le bleu de méthylène pour les deux concentrations testées (1 et 3%). En revanche, aucune coagulation et aucune réduction n'a été constaté avec les isolats (L1 et L3). La figure 26, présente les résultats de la croissance sur lait de Sherman au bleu de méthylène.

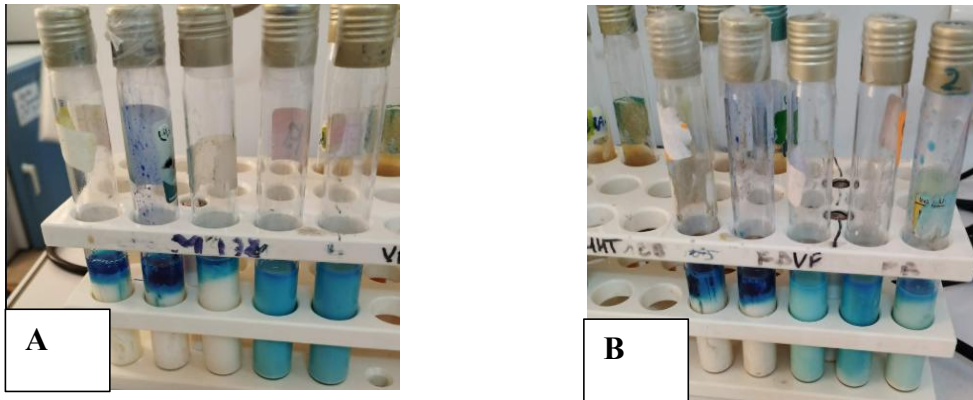


Figure 26 : Résultats du test lait de Sherman au bleu de méthylène. **A:** Lait de Sherman au bleu de méthylène 1% ; **B :** Lait de Sherman au bleu de méthylène 3%.

Les résultats la croissance sur lait de Sherman a permis de séparer les isolats en deux groupes. Les isolats L2, L4 et R1 ont coagulé le lait et ont réduit le bleu de méthylène en présence des deux concentrations testées (1 % et 3 %). Cette réaction permet de conclure que ces isolats présentent une bonne activité métabolique. En revanche, aucune coagulation n'a été constaté en présence des isolats L1 et L3. Ce résultat négatif, indique une absence d'activité. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Sherman (1917)** et **Sherman et Albus (1918)**. Cette méthode constitue une des clefs de caractérisation des bactéries lactiques.

6. Résultats des caractères physiologiques

Tableau 12 : Résultats des critères biochimiques et physiologiques des isolats lactiques.

	L1	L2	L3	L4	R1
Catalase	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+
Forme	Coque	Coque	Coque	Bacille long	Bacille court
Type Fermentaire	Homo-fermentaire				
Croissance à NaCl 4%	+	+	+	+	+
Croissance à NaCl 6,5%	+	-	-	-	-
Croissance à pH 4,5%	-	-	-	-	-
Croissance à pH 9,6%	+	+	+	+	+
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+
Croissance à 45%	+	+	+	+	+
Test thermorésistance 63°C	-	+	-	-	+
Test lait de Shermen 1% Blue méthylène	-	+	-	+	+
Test lait de Shermen 3 % Blue méthylène	-	+	-	+	-

(+): Croissance/ Réaction positive ; (-): Absence/ Réaction négative.

Les variations de température d'incubation constituent un critère physiologique essentiel pour la différenciation des bactéries lactiques, notamment pour distinguer les espèces mésophiles des espèces thermophiles. Les résultats ont montré que les isolats bactériens présentent une bonne croissance à 37°C et 45°C. Cette capacité à se développer à 45°C, témoigne que les isolats ont un profil thermique ou thermo-tolérant.

Les résultats de la croissance à différentes valeurs de pH ont montré que les isolats sont capables de croître à pH 9,6, en revanche, aucune croissance n'a été observée à pH 4,5. Cette croissance témoigne d'une adaptation physiologique importante des bactéries lactiques aux variations du pH du milieu. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Kihal et al., (2006)** et **Badis et al., (2005)**.

Les résultats de la tolérance au NaCl, ont montré que tous les isolats avaient la capacité de croître en présence de 4 % de NaCl. En revanche, l'isolat 1 est le seul à se développer à la concentration de 6,5 % de NaCl. Cette aptitude traduit une bonne tolérance au stress osmotique chez cet isolat. Des résultats similaires ont été rapportés par **Akoğlu (2020)**, qui a observé que certaines souches d'*Enterococcus* isolées de fromage traditionnel étaient capables de croître dans des milieux contenant des concentrations de 4 % et 6,5 % de NaCl. De même, **Karam et Karam (2006)** ont signalé la présence de souches lactiques résistantes à 6,5 % de NaCl dans le lait de chamelle algérien, *Enterococcus* et *Lactococcus lactis*.

L'exposition des isolats à 63 °C pendant 30 minutes a montré que seuls les isolats L2 et R1 se sont révélés thermorésistants. Cette capacité à se développer à une température de pasteurisation démontre que ces derniers sont capables de résister à des fortes températures. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Bekhouché et Boulahrouf (2004)** sur le lait cru en Algérie. Ces auteurs ont démontré que ce traitement thermique élimine la majorité des bactéries lactiques sensibles (comme les *lactocoques*), alors qu'elle permet la survie des souches sauvages les plus résistantes, (*Entérocoques* et *Streptocoques thermophiles*).

6.1 Test Exopolysaccharides

Les résultats de ce test ont montré que tous les isolats Les isolats testés ont présenté un résultat se sont révélés négatifs pour la production d'EPS. Ce résultat est caractérisé par l'absence de colonies muqueuses ou filantes. La figure illustre l'absence de la production d'EPS.



Figure 27 : Absence de production d'EPS chez les isolats étudiés.

Cette absence de production semble être liée à une variabilité génétique et physiologique existant entre les isolats lactiques. En effet, **Looijesteijn *et al.*, (2001)** ont rapporté que la capacité de production des EPS varie considérablement d'une souche à une autre, certaines présentent une production importante tandis que d'autres n'en produisent pas. D'autres études ont également mis en évidence la production d'EPS chez des espèces de bactéries lactiques, notamment *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum* (**Wang *et al.*, 2019**).

7. Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques

Le test d'antibiogramme a été réalisé sur trois isolats lactiques vis-à-vis de dix antibiotiques disponibles au laboratoire. Ces antibiotiques appartiennent à différentes familles. La mesure des diamètres des zones d'inhibitions de chaque isolat pour chacun des antibiotiques testés permet de définir les isolats comme étant résistants ou sensibles. Nous avons considéré que le diamètre de 15 mm est la limite entre un isolat sensible et un isolat résistant. A la lumière des résultats de l'antibiogramme, obtenus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, ont été interprétés selon les recommandations des normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Il ressort que les isolats L2, L3 et L4 ont présenté des profils de sensibilité variables vis-à-vis des antibiotiques testés, notamment à l'amoxicilline AML30, au tétracycline TE30, à la vancomycine VA5, au Gentamicine GEN50 et à la rifampicine RD30µg, tandis qu'une résistance a été notée vis-à-vis de certains antibiotiques tels que l'Oxacilline OX5, l'Ampicilline AMP10 et la Kanamycine CN10.

Il est à signaler que l'antibiotique vancomycine présente une action bactériostatique sur les bactéries lactiques L2 et L4. Les résultats sont regroupés dans le tableau 14 et illustrés par la figure 28.

Tableau 13 : Résultats de l'antibiogramme- zone d'inhibition et interprétation

Isolat	Antibiotique (Charge - Code)	Diamètre Zone	Interprétation
L2	RD30 (Rifampicine 30µg)	23 mm	Sensible
	AML30 (Amoxicilline 30µg)	33 mm	Sensible
	TE 30 (Tétracycline 30µg)	20mm	Sensible
	VA5 (Vancomycine 5µg)	22mm	Sensible
	NA30 (Acide nalidixique 30µg)	Aucune zone	Résistante
	AMP10 (Ampicilline 10µg)	Aucune zone	Résistante
	CN10 (Kanamycine 10µg)	Aucune zone	Résistante
	OX5 (Oxacilline 5µg)	Aucune zone	Résistante
L3	RD30 (Rifampicine 30µg)	27mm	Sensible
	CN10 (Kanamycine 10µg)	10 mm	Résistante
	AML30 (Amoxicilline 30µg)	19mm	Sensible
	NA30 (Acide nalidixique 30µg)	Aucune zone	Résistante
	VA5 (Vancomycine 5µg)	Aucune zone	Résistante
	RD5 (Rifampicine 5µg)	Aucune zone	Résistante
	GEN50 (Gentamicine 50µg)	Aucune zone	Résistante
L4	VA5 (Vancomycine 5µg)	21mm	Sensible
	TE 30 (Tétracycline 30µg)	23mm	Sensible
	GEN50 (Gentamicine 50µg)	23mm	Sensible
	AMP10 (Ampicilline 10µg)	Aucune zone	Résistante
	RD5 (Rifampicine 5µg)	Aucune zone	Résistante
	CN10 (Kanamycine 10µg)	Aucune zone	Résistante

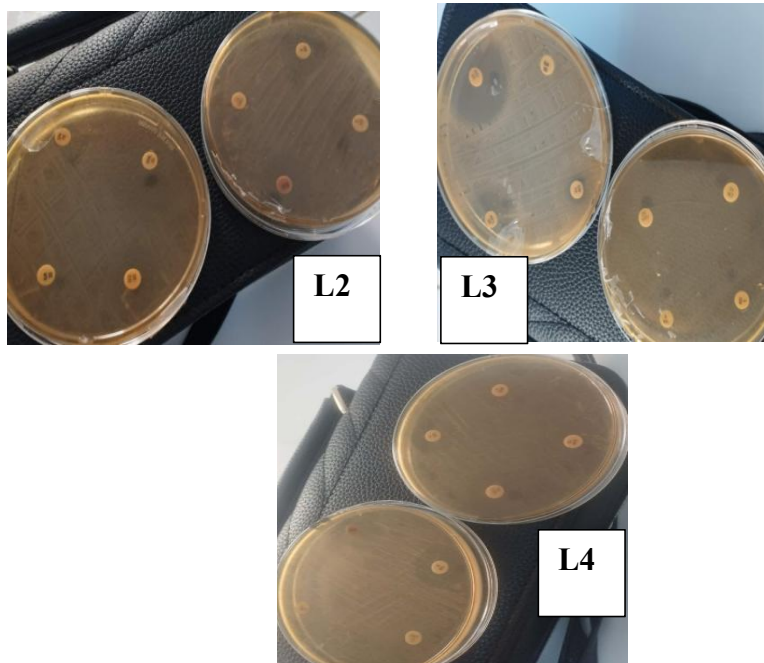


Figure 28 : Résultats de l'antibiogramme des souches L2, L3 et L4.

Les résultats de l'antibiogramme, a permis de mettre en évidence la sensibilité et /ou la résistance des isolats vis-à-vis de dix antibiotiques. Les résultats ont montré que les trois isolats lactiques testés (L2, L3 et L4) présentent des profils de sensibilité variables selon l'antibiotique. Nous avons observé une sensibilité des isolats à l'amoxicilline, dont la zone d'inhibition varie de 19 à 33 mm, à la rifampicine avec une zone allant de 23 à 27 mm et à la tétracycline dont la zone d'inhibition varie de 20 à 23 mm. A l'inverse, une résistance a été notée vis-à-vis de l'oxacilline, de l'ampicilline et la kanamycine.

Enfin, nous avons constaté que les isolats L2 et L4 présente une zone d'inhibition d'environ 22 et 21 mm respectivement. Ses derniers présentent un mode d'action bactériostatique. Nos résultats semble être conformes à certains travaux **Liu *et al.*, (2009)**, **Nøhr-Meldgaard *et al.*, (2023)**, **Wang *et al.*, (2018)** et **Nami *et al.*, (2015)**.

8. Résultats de l'activité antimicrobienne

8.1 Résultats de la méthode de Fleming *et al.*, (1975)

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré que certaines souches possèdent un effet inhibiteur contre les souches indicatrices testées. Par la méthode de double couche, les souches L2 et L4 ont présenté des zones d'inhibition contre *Staphylococcus aureus* de 15 mm et 13 mm respectivement.

8.2 Résultats de la méthode de Barefoot et Klaenhammer

Les isolats lactiques ont été testés par cette méthode, afin de sélectionner les bactéries productrices de substances antimicrobiennes. Cette activité a été réalisée vis-à-vis de trois souches, deux bactériennes et une fongique. Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des isolats lactiques avec les souches indicatrices. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les résultats enregistrés ont permis de constater que seul l'isolat R1 a révélé une activité vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec une zone d'inhibition avoisinant 10 mm, en revanche, aucune inhibition n'a été observée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Les résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*, ont montré que les isolats R1, L3 et L4 présentent des zones d'inhibition de 15 mm, 10 mm et 10 mm respectivement. Le tableau 14, présente les résultats de l'activité antimicrobienne et les figures 29 et 30 illustrent cette activité.

Tableau 14 : Activité antimicrobienne et antifongique des isolats de bactéries lactiques.

Souches	Activité Antibactérienne (Double couche) Vs <i>S.aureus</i>	Activité Antibactérienne (Puits) Vs <i>E.coli</i>	Activité Antibactérienne (Puits) Vs <i>S.aureus</i>	Activité Antifongique Vs <i>C.albicans</i>
L2	15 mm	0	0	0
L3	0	0	0	10 mm
L4	13 mm	0	0	10 mm
R1	0	10 mm	0	10 mm



Figure 29 : Activité antimicrobienne des souches lactique vis - à - vis de *Staphylococcus aureus* pa method de double couche (A) et méthode des puits (B) résultats négatif.



Figure 30 : Activité antimicrobienne et antifongique des souches lactiques vis-à-vis D'*E.coli* (A) et *candida albicans* (B) par la méthode des puit.

Cette activité s'explique par la capacité des bactéries lactiques à produire des substances antimicrobiennes telles que les acides organiques, du diacétyle, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. Ces composés contribuent à augmenter l'acidité du milieu de culture, créant ainsi des conditions défavorables à la croissance des micro-organismes pathogènes. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Yang et al., (2012)**, qui ont démontré une activité inhibitrice des isolats lactiques : vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Nos résultats rejoignent aussi les travaux de **Crowley et al., (2013)**, qui ont démontré une activité antifongique des isolats lactiques contre *Candida albicans*. Cela suppose que ces isolats produisent des métabolites antifongiques capables d'inhiber la croissance des moisissures et des levures.

Enfin, selon **De Vuyst et Leroy (2007)**, les germes lactiques présentent une importance majeur dans le maintien de la qualité microbiologique des aliments. A travers ces résultats, nous pouvons conclure que certains isolats lactiques peuvent présenter un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens naturels.

Conclusion et perspective

Le lait est considéré comme un aliment complet et équilibré du fait de sa richesse en plusieurs éléments nutritifs (protéines, lipides, sels minéraux, lactoses et vitamines) et considéré comme un milieu favorable pour les bactéries lactiques. Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la conservation des aliments, le développement des saveurs et la protection de la santé humaine. Elles occupent une place essentielle dans les industries agroalimentaires et laitières. Le lait de vache recèle une grande richesse de constitution. En moyenne, un litre de lait cru contient près de 900 g d'eau et 130 g d'extrait sec, en proportion variable : 40 g de matière grasse, 45 g de lactose, 35 g de matières azotées, 09 g d'éléments minéraux.

L'étude expérimentale a impliqué la réalisation d'analyses physico-chimiques, notamment la mesure du pH et de l'acidité titrable des échantillons de lait, ensuite plusieurs analyses microbiologiques ont été effectuées visant à rechercher la flore totale, les coliformes, les Staphylocoques, les levures et moisissures, et les bactéries lactiques dans les échantillons de lait de vache. Les analyses physico-chimiques indiquent que les deux échantillons de lait de vache sont conformes aux normes applicables en matière de pH et d'acidité dornic. L'analyse microbiologique a révélé une différence de qualité entre les échantillons de lait analysés. Ce travail a permis d'isoler et de caractériser macroscopiquement et microscopiquement des isolats lactiques isolés à partir de deux échantillons de lait cru de vache collecté dans deux régions (Ain Témouchent et Tlemcen) et d'un troisième échantillon de lait fermenté (Raïb), ensuite évaluer leur potentiel antimicrobien. Les analyses physico-chimiques ont révélé des valeurs de pH et d'acidité titrable plus ou moins conformes aux normes du lait frais. Les analyses microbiologiques ont confirmé l'absence de germes pathogènes (coliformes, Staphylocoques), témoignant d'une qualité sanitaire satisfaisante. L'isolement sur milieu sélectif M17 et/ou MRS a permis d'obtenir cinq isolats de bactéries lactiques à coloration Gram positif et catalase négatifs. Après purification, les tests d'identification morphologique, physiologique et biochimique ont montré que certains isolats se sont révélés des germes thermophiles et homofermentaires, rattachés aux genres *Streptococcus* ou *Enterococcus*, alors que d'autres se sont montrés des germes mésophiles et hétérofermentaires, rattachés au genre *Lactobacillus*. Les isolats se sont montrés tolérants au sel et aux variations de pH, et ont démontré une activité réductrice dans le milieu à base de lait de Sherman. A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que nos résultats ont révélé une diversité entre les isolats en termes de tolérance aux conditions de culture et de comportement physiologiques. Les profils de résistance aux antibiotiques ont montré que les isolats possèdent une résistance à certains

antibiotiques testés, alors que d'autres ont montré des profils de sensibilité. L'étude de l'activité antimicrobienne a révélé que certains isolats lactiques possèdent un pouvoir inhibiteur non négligeable contre *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Ces résultats offrent quelques perspectives et peuvent être complétés par :

- ✓ Une étude approfondie d'identification des isolats lactiques à l'aide d'outils moléculaire (PCR et séquençage)
- ✓ Une évaluation des propriétés probiotiques permettant de valoriser ces isolats dans les filières laitières.
- ✓ Il est également souhaitable de multiplier les échantillons de lait de vache et de diversifier l'origine afin de pouvoir établir un screening (sélection) efficace des isolats lactiques.

Références bibliographiques

Acquavia, M. A., Villone, A., Rubino, R., et; Bianco, G. (2025). A comprehensive review of milk components: Recent developments on extraction and analysis methods. *Molecules*, 30(9), 1994.

AFNOR. (1986). Lait et produits laitiers : méthodes d'analyse. AFNOR.

Agirman, B., Yildiz, I., Polat, S., et Erten, H. (2024). Évaluation des jus de carotte noire, de chou vert, de raisin et de pomme comme substrats pour la production de boissons fonctionnelles de type kéfir d'eau. *Food Science & Nutrition*, 12, 6595–6611.

Ahmed, M., Kebede, E., et Tessema, T. (2024). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in dairy farms. *BMC Microbiology*, 24(1), 112.

Akoğlu, A. (2020). The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology Letters*, 42(3), 481–492.

Al-Kharousi, Z. S. (2025). Highlighting lactic acid bacteria in beverages: Diversity, fermentation, challenges and future perspectives. *Foods*, 14(12), 2043.

Amiot, J., Fournier, S., Lebœuf, Y., Paquin, P., Simpson, R., et Turgeon, H. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In *Science et technologie du lait : Transformation du lait*. École Polytechnique de Montréal.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., et Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility. *Food Control*, 17, 454–461.

Anumudu, C. K., Miri, T., et Onyeaka, H. (2024). Multifunctional applications of lactic acid bacteria: Improving the safety, quality and nutritional value of fermented foods and beverages. *Foods*, 13(23), 3714.

Axelsson, L. (2004). Classification and physiology. In S. Salminen et A. Von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*.

Baazize-Ammi, D., Gharbi, I., Dechicha, A. S., Kebbal, S., Hadj Omar, Z., Hezil, N., et Guetarni, D. (2019). Qualité bactériologique et sanitaire du lait cru de bovins des circuits direct et indirect dans la région centre de l'Algérie. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 7(2).

Bekhouche, F., et Boulahrouf, A. (2004). Étude quantitative et qualitative des bactéries lactiques du lait cru. *Sciences et Technologie*, C(21), 38–43.

Benyoub, K., et al. (2023). Évaluation microbiologique du lait cru de vache collecté dans la région de Bordj Bou Arreridj. Université de Bordj Bou Arreridj.

Björkroth, J., et Holzapfel, W. H. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. Dans M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (3rd ed., Vol. 4, pp. 267–319). Springer.

Car, F. J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370.

Colinet, F., Soyeurt, H., Anceau, C., Vanlierde, A., Keyen, N., Dardenne, P., Gengler, N., et Sindic, M. (2010). Potential estimation of titratable acidity in cow milk using mid-infrared spectrometry. *ICAR Technical Series*, 14.

Conte, S. (2008). Évolution des caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques du lait caillé traditionnel (Mémoire d'études approfondies). Université Cheikh Anta Diop.

Crowley, S., Mahony, J., et Van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 33(2), 93–109.

Czarnowska-Kujawska, M., et Paszczyk, B. (2021). Changes in folate content and fatty acid profile of fermented milk produced with different starter cultures during storage. *Molecules*, 26, 6063.

Darvishzadeh, P., Orsat, V., et Martinez, J. L. (2021). Process optimization for developing a novel antioxidant-rich water kefir beverage with potential probiotic properties from Russian olive fruits (*Elaeagnus angustifolia*). *Food and Bioprocess Technology*, 14, 248–260.

De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G., Curci, M., Siragusa, S., Crecchio, C., Parente, E., et Gobbetti, M. (2007). Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 69–82.

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., et Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 3). Springer.

De Vuyst, L., et Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194–199.

Deddefo, M., Gemechu, T., et Bekele, D. (2024). Microbiological quality and public health risks associated with raw milk consumption. *BMC Microbiology*, 24, 287.

El-Ziney, M. G., Uyttendaele, M., Debevere, J., et Jakobsen, M. (1998). Characterization of the locus responsible for bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4472–4483.

Federighi, M. (2005). *Bactériologie alimentaire* (2e éd.). Economica.

- Fernandes, A., et Jobby, R. (2022).** Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, 4377–4399.
- Ferreira, C. L. L. F. (2012).** Grupo de bactérias lácticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In *Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção* (pp. 1–27).
- Fleurette, R. V. (2003).** Qualité sanitaire des fromages artisanaux dans la région Antsirabe (Mémoire d'ingénieur). Université d'Antananarivo.
- Galli, V., Venturi, M., Mari, E., Guerrini, S., et Granchi, L. (2022).** Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) in fermented milk by lactic acid bacteria isolated from spontaneous raw milk fermentation. *International Dairy Journal*, 127, 105284.
- Gallier, S., Tolenaars, L., Prosser, C. (2020).** The nutritional components and quality of milk are influenced by the rumen microbiota and its metabolites at different lactation stages. *Journal of Dairy Science*, 107(10), 8709–8721.
- Gaucheron, F. (2005).** The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473–483.
- Gouttaya, A., Al-Zoghbi, M. A., et Sraïri, M. T. (2013).** Sources de contamination et mesures de prévention de la qualité microbiologique du lait de vache cru. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 66(3), 95–110.
- Guan, Y., Cui, Y., Qu, X., Li, B., et Zhang, L. (2025).** Post-acidification of fermented milk and its molecular regulatory mechanism. *International Journal of Food Microbiology*, 426, 110920.
- Guiraud, J. P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod.
- Hadef, S. (2012).** Évaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales (Mémoire de magister en microbiologie appliquée). Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie.
- Hansal, N., Benmechernene, Z., et Mebrouk, K. (2024).** Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from raw goat milk. *Journal of Applied Biological Sciences*, 18(1), 14–32.
- Hassaine, O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du Sud algérien (Thèse de doctorat). Université d'Oran, Algérie.
- Helmenstine, A. M. (2019).** What is the acidity or pH of milk? ThoughtCo.
- Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., Cano-Sarmiento, C., Fajardo-Espinoza, F., Avila-Reyes, S., et Figueroa-Hernández, C. (2021).** ACE inhibitory and metal-binding activities produced during milk fermentation by three probiotic laboratory strains isolated from Chiapas double cream cheese. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20, 97–112.

- Huang, R., Wu, F., Zhou, Q., Wei, W., Yue, J., Xiao, B., et Luo, Z. (2022).** *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications. *Microbiological Research*, 260, 127019.
- Huizhi Yuan, S., Han, S., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Lu, H., et Wang, S. (2024).** Microbial properties of raw milk throughout the year and their relationships to quality parameters. *Foods*, 11(19), 3077.
- Institut Pasteur d'Algérie (IPA). (2003).** Catalogue des milieux de culture et réactifs de laboratoire. Sarl Félicité Agency, Alger.
- Jakob, E., Winkler, H., et Haldemann, J. (2009).** Critères microbiologiques pour la fabrication du fromage. Agroscope Liebefeld-Posieux.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., et Brulé, G. (2008).** Les produits laitiers. Tec and Doc Lavoisier.
- Kakati, S., Talukdar, A., Hazarika, R. A., Raquib, M., Laskar, S. K., Saikia, G., et Hussein, Z. (2021).** Bacteriological quality of raw milk marketed in and around Guwahati city, Assam, India. *Veterinary World*, 14(3), 656–660.
- Karam, H. Z., et Karam, N. E. (2004).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24(3), 153–156.
- Katinan, C. R., Sadat, A. W., Chatigre, K. O., Bohoussou, K. M., et Assidjo, N. E. (2012).** Évaluation de la qualité chimique et microbiologique des laits caillés artisanaux produits et consommés dans la ville de Yamoussoukro, Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 55, 4020–4027.
- Ketrouci, L. (2021).** Étude physico-chimique et microbiologique du lait de brebis collecté dans différentes régions d'Algérie : détermination de la flore lactique et des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques (Thèse de doctorat). Université de Mostaganem, Algérie.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., et Reuter, G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103–125.
- Kouadri, B., Ait Kaki, A., Meddah, B., et Bendimerad, N. (2023).** Probiotic properties of lactic acid bacteria newly isolated from Algerian raw cow's milk. *Microorganisms*, 11, 2091.
- Kouakou, P., et Thonart, P. (2011).** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2), 339–348.
- Lamontagne, M., Champagne, C. P., Reitz, A. J., Moineau, S., Gardner, N., Lamoureux, M., Jean, J., et Fliss, I. (2002).** Microbiologie du lait. Dans C. Vignola (Éd.), *Science et technologie du lait : transformation du lait* (pp. 75–128). École Polytechnique de Montréal.

- Larpent, J. P., Copin, M. P., Germonville, A., Jaquet, M., et Thetas, J. L. (1997).** Microbiologie du lait et des produits laitiers. Tecand Doc Lavoisier.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., et Labrie, S. (2012).** Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92,455–468.
- Lescure, A., Blanc, A. 2002.** Microbiologie et Hygiène.Cours 2ème année, génie biologique diététique. Montpellier, France.
- Léonard, L. (2013).** Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique (Thèse de doctorat). Université de Bourgogne, France.
- Lima, E. A., Vieira, A. D., Silva, N. D., et Santos, M. J. S. (2020).**Influence of filamentous fungi and yeasts on raw milk quality. *Research, Society and Development*, 9(7), e413974.
- Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., et Guo, X. K. (2009).**Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(5), 401–412.
- Luis, J. J., Ricoy, P. C., Bianchi, A. C., Ricardo, P. C., et Sabioni, J. G. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 512–542.
- Magnusson, M., Christiansson, A., et Svensson, B. (2007).**Bacillus cereus spores during housing of dairy cows: Factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 2745–2754.
- Makhloufi, K. M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza (Thèse de doctorat). Université Pierre et Marie Curie, France.
- Mameche-Doumandji, A. (2008).** Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées (Thèse de doctorat). Institut National Agronomique, Algérie.
- Mami, A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie (Thèse de doctorat). Université d'Oran, Algérie.
- Meade, E., Slattery, M. A.,et Garvey, M. (2020).** Bacteriocins: Potent antimicrobial peptides and the fight against multidrug-resistant species. *Antibiotics*, 9, 32.
- Molujin, A. M., Abbasiliasi, S., Nurdin, A., Lee, P. C., Gansau, J. A., et Jawan, R. B. (2022).**Bacteriocins as potential therapeutic approaches in the treatment of various cancers: A review of in vitro studies. *Cancers*, 14, 4758.
- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., et Wiedmann, M. (2016).** Influence of raw milk quality on processed dairy products. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128–10149.

- Nami, Y., Haghshenas, B., Haghshenas, M., et Yari Khosroushahi, A. (2015).** Antimicrobial activity and the presence of virulence factors and bacteriocin structural genes in *Enterococcus faecium* CM33 isolated from ewe colostrum. *Frontiers in Microbiology*, 6, 782.
- Nikitina, E., Petrova, T., Vafina, A., Ezhkova, A., Yahia, M. N., et Kayumov, A. (2022).** Textural and functional properties of skimmed and whole milk fermented by a novel strain of *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 isolated from silage. *Fermentation*, 8, 290.
- Nøhr-Meldgaard, K., Struve, C., Ingmer, H., et Agersø, Y. (2023).** Antimicrobial susceptibility testing and tentative epidemiological cut-off values for *Lactobacillaceae* species intended for ingestion. *Frontiers in Antibiotics*, 2, 1162636.
- Ok, S., Yilmaz, E., et Demirel Zorba, N. N. (2024).** Preparation and characterization of 3D-printed objects based on different kefir gels. *Food Biophysics*, 19, 453–470.
- Orla-Jensen, S. (1919).** The lactic acid bacteria (Vol. 3). A. F. Host.
- Pereira, P. C. (2014).** Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30, 619–627.
- Perreau, J. M. (2014).** Conduire son troupeau de vaches laitières (2e éd.). France Agricole.
- Potts, A., et Peterson, D. (2019).** Identification and analysis of volatile compounds in milk and dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Pougheon, S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière (Thèse vétérinaire). École Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.
- Rahmadini, A. S., Asben, A., Dewi, K. H., et Ermita, Y. (2024).** Physicochemical properties of pasteurized cow's milk: A review. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, 8(2), 267–281.
- Reddy, G., Altaf, M. D., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., et Kumar, E. V. (2008).** Amylolytic lactic acid bacterial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 26(1), 22–34.
- Roca-Fernández, A. I. (2014).** Animal factors conditioning milk performance and quality of grazing dairy cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4, 1–20.
- Salminen, S., & Von Wright, A. (2004).** Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. CRC Press.
- Savado, A., et Traoré, A. S. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2057–2075.

- Scardovi, V. (1965).** The genus *Bifidobacterium*. Dans *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press.
- Scuotto, A. (2015).** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*.
- Sherman, J. M. (1917).** Some bacteriological tests of the milk clarifier. *Journal of Dairy Science*, 1(3), 272–278.
- Sherman, J. M., et Albus, W. R. (1918).** Some characters which differentiate the lactic acid streptococcus from streptococci of the pyogenes type occurring in milk. *Journal of Bacteriology*, 3(2), 153–174.
- Soleha, S., et Hanifa, A. Q. (2024).** A polyphasic approach to the exploration of lactic acid bacteria from Tempoyak in South Sumatra. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 13(3), 523–536.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., et Zhang, H. (2014).** Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. Dans *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* (pp. 1–101).
- Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjöblom, M., Joutsen, M., Palva, A., Ryhänen, E. L., et Joutsjoki, V. (2004).** Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology*, 39(5), 439–444.
- Touati, D. (2000).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Journal of Food Microbiology*, 122, 312–320.
- Troch, T., Lefébure, É., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., et Sindic, M. (2017).** Cow milk coagulation: Process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21.
- Van de Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J. P., et Voragen, A. G. J. (2008).** *Bifidobacterium* carbohydrate metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 187–216.
- Vignola, C. (2002).** *Science et technologie du lait : Transformation du lait*. Presses Internationales Polytechnique.
- Vimercati, W. C., da Silva Araújo, C., Macedo, L. L., Fonseca, H. C., Guimarães, J. S., de Abreu, L. R., et Pinto, S. M. (2020).** Physicochemical, rheological, microbiological and sensory properties of a newly developed coffee-flavored kefir. *LWT*, 123, 109069.
- Wang, F., Zhou, H., Olademehin, O. P., Kim, S. J., et Tao, P. (2018).** Overview of key interactions between vancomycin and bacterial cell wall structures. *ACS Omega*, 3(1), 37–45.

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., et Walker, B. (2012). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 2(1), 10.

Yuan, H., Zhang, J., Liu, Y., Chen, W., et Li, H. (2022). Microbial diversity and composition of raw milk and their impact on milk quality and safety. *Foods*, 11(12), 1752.

Zergoug, A. (2017). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des agents pathogènes responsables des infections urinaires (Thèse de doctorat). Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.

Zhao, Y., Zhao, H., Li, L., Tan, J., Wang, Y., Liu, M., et Jiang, L. (2023). Multi-omics analysis reveals that the metabolite profile of raw milk is associated with dairy cows' health status. *Food Chemistry*, 428, 136813.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

Milieu PCA

Peptone de caséine.....	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose.....	1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1 L

Chapman

Peptone.....	10,0 g
Extrait de viande de bœuf	1,0 g
Chlorure de sodium.....	75,0 g
Mannitol.....	10,0 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Agar.....	15,0 g

pH=7,4

Déoxycholate (0,1 %)

Peptone.....	10,0 g
Citrate de sodium.....	1,0 g
Lactose.....	10,0 g
Rouge neutre.....	0,03 g
Désoxycholate de sodium.....	5,0 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	2,0 g
Agar.....	13,0 g

pH= 7,3

Annexe 2

Gélose Sabouraud Chloramphénicol

Peptone de caséine.....	5 g
Peptone de viande.....	5 g
Glucose monohydraté.....	40 g
Chloramphénicol.....	5 mg
Agar.....	20 g
eau distillée.....	1L

Milieu MRS (Man, Rogasa et Sharpe) (pH6,5)

Peptone	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bi potassique.....	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O.....	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Annexe 3

Milieu M17(pH7,2)

Tryptone.....	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papaïnique de soja	.5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	.5g
Lactose	.5g
Glycéro phosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Agar-agar	15g

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g

pH 7.4 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Annexe 4

Bleu de méthylène à 1%

Bleu de méthylène (poudre) 2,5 g

Eau distillée.....250 ml

Dans une fiole de 250 ml, versez 2,5 g de poudre bleu de méthylène , Complétez jusqu'à 250 ml avec d'eau distillée .Agitez pendant 1 heure et laissez reposer 24 heures avant filtrage ,

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Pour le Bleu de Méthylène à 3%

Bleu de méthylène (poudre)7,5 g

Eau distillée 250 ml

Dans une fiole de 250 ml, versez 7,5 g de poudre bleu de méthylène ,Complétez jusqu'à 250 ml avec d'eau distillée. Agitez pendant 1 heure et laissez reposer 24 heures avant filtrage ,

Autoclavage 120°C/ 20 minutes