

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 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



**Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Science Biologique

**Spécialité/Option :** Microbiologie Appliquée

**Département :** EGE

**Thème**

---

**Screening bactériologique du lait maternel**

---

**Présenté par :**

Mell.BOURNANE Marwa

Mell.GHOMRIANE Fatima Zahra

Mell.LOUCIF Lina

**Devant le jury composé de :**

**Président : Dr. TORCHE** Esmaa

**Université de Guelma**

**Examineur : Dr. BEDIQUI** Soraya

**Université de Guelma**

**Encadreur : Dr. BOUSSADIA** Meriem Imen

**Université de Guelma**

**Juin 2023**

## *Remerciements*

**Tout d'abord, nous remercions Allah pour nous avoir donné de la force,  
la patience et la volonté d'accomplir ce travail modeste.  
Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury qui ont accepté  
d'évaluer notre travail, Dr. S. Bedioui et Dr. A. Torche  
en tant que présidente de  
jury .**

**Nos sincères remerciements sont adressés à notre  
encadreur Dr. I . Boussadia,  
qui a fait pour nous un travail  
supplémentaire et nous a guidé lors de l'élaboration de ce travail avec  
ses encouragements, sa patience et ses conseils judicieux, nous la prions  
d'accepter nos sincères remerciements, notre profond respect et entiers  
dévouements.**

**Nos remerciements vont également à tout le corps enseignant de la  
faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Guelma.  
Enfin, on adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont  
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.**

**Merci tout le monde  
Lina, Fatima Zahra, Marwa.**

## *Dédicace*

Avec l'aide et le succès **D'ALLAH** et d'un cœur plein d'amour.

Je dédie ce travail à :

Mon père Mr. Loucif Sassi tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours.

Ma mère, Aucun mot n'est assez fort pour te remercier de m'avoir donné une vie que tu as su remplir d'amour, de joie...

Que ce travail soit pour vous deux le témoignage de mon infinie reconnaissance pour vous aide précieuse et toutes ces années de compréhension.

Que dieu vous donne la santé et longue vie.

Ma chère grand-mère.

Mes chères sœurs Selma, Oumaima, Jana.

Mon cher frère Mohammed Saleh.

Mme Ghraib Nora pour m'avoir soutenue toutes ces années.

Mes binômes Marwa et Fatima

Je vous remercie pour votre soutien toutes ces années à travers les moments de joie et de tristesse que nous avons vécus ensemble.

À toutes les mères donneuses qui ont contribué à cette étude.

Toute ma famille, mes amies, mes collègues et mes proches.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu, merci beaucoup.

♥ Je vous aime ♥



*Loucif Lina*

## *Dédicace*

Grace à Allah, je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, pour leur soutien inconditionnel dans tout ce que j'ai pu entreprendre dans ma vie, leurs encouragements, leurs sacrifices. Eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers chemin de la réussite « Papa, Mama merci pour tout » ;

À mes chères frère et sœurs;

Abdelnour, Nada, Hadil, Abdelkader, et Mouhamed;

À mes tantes Djahida et Mordjana; À ma petite Razan;

À mon cher cousin Seif, à mes cousines Kawther, Khawla, Amal et Warda;

À mes binômes Marwa et Lina;

Je vous remercie pour votre soutien tout le long de ces années et pour les moments passés de joie ou de tristesse toujours on a été épaulés l'un à l'autre;

À tous ceux qui me sont chers.

A vous tous, famille, amis, collègues, merci de m'avoir encouragé durant toutes ces années.

Je dédie ce travail à toutes les mamans qui nous aidèrent pour faire cette étude;

À tous mes professeurs durant les cycles de ma scolarité;

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce

Travail.



*Ghomriane Fatima Zahra*

# *Dédicaces*

Grace à Allah

Je dédié ce travail à

Mes très chers parents, pour leur soutien incondtionnel dans tout ce que J'ai pu entreprendre dans ma vie, leurs encouragements, leurs sacrifices. Eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers chemin de la réussite « Papa, Mama merci pour tout »

À mes binômes Lina et Fatma

Je vous remercie pour votre soutien tout le long de ces années et pour les moments passés de joie ou de tristesse toujours on a été épaulés l'un à l'autre.

Mes adorables sœurs : « Sara», «Safa» ;

Mon cher frère : « Salah »

je remercie le mari de ma sœur « hamo » et leur fils « Islem »

je remercie toutes les mères donatrices pour leur soutien et leur contribution à la réalisation de ce travail

A vous tous, famille, amis, collègues, merci de m'avoir encouragé

durant toutes ces années



*Bournane Marwa*

# Sommaire

Remerciements	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction .....	1
Synthèse bibliographique .....	3
II. Le lait maternel :.....	3
II.1 Anatomie descriptive de la glande mammaire.....	3
II.2. La production de lait maternel.....	4
II.3 Composition de lait maternel.....	5
II.3.1 Composition en macronutriments du lait humain.....	6
II.3.2 Composition en micronutriments du lait maternel.....	8
II.3.3 Composition en composés bioactif.....	10
III. Les bactéries lactiques.....	11
III.1. Caractéristiques générales.....	11
III.2 Habitat.....	12
III.4 Classification.....	13
III.4. Bactéries lactiques et lait maternel.....	15
III.4.1. Leur Origine dans le lait maternel.....	15
III.4.2. Rôle du microbiote du lait maternel dans l'intestin du nourrisson.....	17
IV. Les probiotiques .....	18
IV.1. Microorganismes probiotiques .....	18
IV.2. Potentiel probiotique et mécanismes d'action des bactéries lactiques.....	18
IV.2.1 Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments .....	19

IV.2.2 Antagonisme direct.....	19
IV.2.2.1 Acides organiques.....	20
IV.2.2.2 Peroxyde d'hydrogène.....	20
IV.2.2.3. Dioxyde de carbone.....	20
IV.2.2.4. Diacétyl.....	20
IV.2.2.5. Reutérine.....	21
IV.2.2.6. Bactériocine.....	21
IV.2.2.6.1 Mode d'action.....	21
IV.2.3 Modulation de la virulence des bactéries pathogènes.....	23
IV.2.4 Stimulation du système immunitaire systémique.....	24
V. Matériel et méthodes.....	26
V.1. Cadre d'étude.....	26
V.2. Collecte du lait.....	26
V.3. Numération.....	27
V.4. Isolement et purification des BL.....	30
V.5. Conservation des BL.....	30
V.6. Identification.....	31
V.6.1. Caractères cultureux et morphologiques.....	31
V.6.2. Caractères physiologiques.....	32
V.6.3. Caractères biochimiques.....	33
V.7. Dépistage du pouvoir antagoniste des isolats lactiques contre les bactéries pathogènes.....	37
V.7.1. Méthode de puits.....	38
VI. Résultats et discussion.....	39
VI.1. Résultat du dénombrement de la flore lactique.....	39
VI.2. Criblage primaire de la flore lactique.....	39
VI.2.1. Aspect macroscopique et microscopique.....	39
VI.3. Résultats de l'identification de la flore lactique.....	46
VI.3.1. Caractères physiologiques.....	46
VI.3.2. Caractères métaboliques.....	49

VI.3.2.1. Tests complémentaires .....	49
VI.3.3. Caractères biochimiques .....	49
VI.4. Activité antibactérienne des isolats lactiques .....	54
VII.Conclusion.....	58
Résumé.....	
Abstract.....	
الملخص .....	
Annexes.....	
Références.....	

## Liste tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition en nutriments et en composés bioactifs du lait humain mature.....	9
<b>Tableau 2</b> : Quelques caractéristiques des bactéries lactiques.....	12
<b>Tableau 3</b> : Présentation des espèces des bactéries lactiques a, b.....	14
<b>Tableau 4</b> : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés).....	25
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques des souches de références.....	38
<b>Tableau 6</b> : Criblage primaire des souches isolées sur milieu MRS (a) et M17 (b).....	40.41
<b>Tableau 7</b> : Caractéristiques des bactéries Gram - isolées sur M17.....	46
<b>Tableau 8</b> : Caractères physiologiques de BL sur milieu MRS .....	47
<b>Tableau 9</b> : Caractères physiologiques de BL sur milieu M17.....	48
<b>Tableau 10</b> : Profil biochimique des espèces isolées sur MRS.....	49
<b>Tableau 11</b> : Profil biochimique des espèces isolées sur M17.....	50
<b>Tableau 12</b> : Profil biochimique des bactéries Gram- isolées sur M17.....	50
<b>Tableau 13</b> : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques.....	53
<b>Tableau 14</b> : Critères d'identification du <i>Bifidobacterium</i> et le <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	54
<b>Tableau 15</b> : Résultats de l'activité antibactérienne des souches lactique testées.....	55

## Liste figures

<b>Figure 1</b> : Schéma d'une coupe transversale du sein montrant ses différentes structures.....	3
<b>Figure 2</b> : Voies neuro-hormonales de régulation de la production de lait.....	5
<b>Figure 3</b> : Exemple d'oligosaccharide du lait humain .....	8
<b>Figure 4</b> : composants protecteurs du lait maternel.....	10
<b>Figure 5</b> : Observation au microscope électronique (x10000) de : (a) <i>Lactobacillus Rosell-11</i> ;(b) <i>Leuconostoc lactis</i> .....	11
<b>Figure 6</b> : Origine de l'enrichissement microbien du lait maternel "voie oro entéro /mammaire " et "transfert rétrograde.....	16
<b>Figure 7</b> : mécanismes d'action des probiotique.....	19
<b>Figure 8</b> : mode d'action des bactériocines des bactérie lactique.....	22
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique des différents types de compétition pour une niche écologique entre BL et pathogènes.....	23
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de l'impact des BL sur les cellules épithéliales de l'hôte.....	24
<b>Figure 11</b> : Photo d'échantillons de lait maternel.....	27
<b>Figure 12</b> : Procédure de dénombrement des BL.....	29
<b>Figure 13</b> : Aspect macroscopique des BL purifiées.....	30
<b>Figure 14</b> : Coloration différentielle de Gram des colonies issues de milieux MRS .....	32
<b>Figure 15</b> : Mesure de pH tests pour la culture des BL.....	32
<b>Figure 16</b> : Test catalase.....	33
<b>Figure 17</b> : Test du cytochrome oxydase .....	34
<b>Figure 18</b> : Interprétation des résultats du TSI .....	35
<b>Figure 19</b> : Test du Mannitol-mobilité .....	36
<b>Figure 20</b> : Test du Citrate de Simmons.....	37
<b>Figure 21</b> : Répartition de la flore lactique dans les milieux MRS et M17.....	39

<b>Figure 22</b> : Aspect macroscopiques des isolats bactériens sur milieux MRS et M17.....	42
<b>Figure 23</b> : Aspect microscopique des isolats bactériens sur MRS (microscope photonique, Gr : x100).....	43
<b>Figure 24</b> : Aspect microscopique des isolats bactériens sur milieu M17 (microscope photonique, Gr : x100).....	44
<b>Figure 25</b> : Autres bactéries isolées à partir du lait maternel sur milieu M17 (microscope photonique, Gram : x100).....	45
<b>Figure 26</b> : Caractérisation physiologique des BL (a) : températures variables ; (b) : différents pH ; (c) : concentrations variables de NaCl.....	48
<b>Figure 27</b> : Résultats des tests complémentaires (a) : Catalase - ; (b) : Oxydase.....	49
<b>Figure 28</b> : Identification des caractères métaboliques par galerie classique et système API.....	51
<b>Figure 29</b> : effet antibactériens des BL sur les souches cibles.....	56
<b>Figure 30</b> : Schéma récapitulatif du mode d'action des BL sur des souches pathogènes.....	57

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**°C** : Degré celsius

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AFNOR** : Association Française de normalisation

**Agr**: Accessory gene regulator

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATP**: Adénosine-Triphosphate

**BL** : Bactéries lactique

**CD** : clusters of différenciation

**CD**: cluster de différenciation

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**FAO** : Food and Agriculture Organization.

**Fig** : Figure

**g** : gram.

**Glu** : glucose

**GN** : gélose nutritive

**H** : heure

**H<sub>2</sub>S** : hydrogène sulfuré

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

**HCl** : acide chlorhydrique

**Ig** : Immunoglobuline

**IgAs** : Immunoglobulines A sécrétoires

**IL** : Interleukine

**IMC** : Indice de masse corporel

**Jrs** : jours

**L**: *Lactobacillus*

**L**: litre

**Lac** : lactose

**LT4** : Lymphocyte T 4

**LT8**: Lymphocyte T 8

**Min**: minute

**mL**: millilitre

**mOsm**: microosmole

**MRS** : milieu de Man, Rogosa et Sharpe

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**O<sub>2</sub>** : oxygène moléculaire

**OLH ou HMO** : Human Milk Oligosaccharides

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**pH** : potentiel d'hydrogène

**S**: seconde

**Sac** : saccharose

**SSL11**: Staphylococcal Superantigen-Like protein 11

**Ssp** : sous - espèce

**Sp** : espèce inconnue

**T°**: Température

**Th:** T helper

**TNF-alpha:** Facteur de Nécrose Tumorale

**tr/min :** tour par minute

**TSI :** Triple sugar iron

**UFC :**Unité formant colonie

**VIH:** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**WHO:**World Health Organization

**µl :** microlitre

# I ntroduction

Le lait maternel est un aliment de choix assurant la nutrition d'un nouveau-né. Ce fluide biologique complexe contenant des milliers de composants dont la composition, comme celle de tous les mammifères, est spécifique à l'espèce et adaptée aux besoins particuliers des petits humains. Il contient des macronutriments (protéines, lipides et glucides), des micronutriments (minéraux et vitamines) et un grand nombre de facteurs bioactifs (Aakko, et al., 2017).

L'Organisation Mondiale de la Santé recommande un allaitement exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois du fait de bénéfices santé reconnus. Cependant la prévalence de l'allaitement reste faible au niveau mondial. En Algérie, et les différentes enquêtes nationales portant sur la santé de la mère et l'enfant ont montré un net recul du pourcentage d'enfants allaités (Guid, 2009). Alors que l'allaitement est généralement considéré comme important pour la santé et le développement d'un enfant, des données récentes mettent en évidence l'impact significatif que l'allaitement peut avoir sur la santé future de la mère. Le rôle de l'allaitement dans la prévention du cancer du sein est documenté depuis de nombreuses années dans le cadre de la quatrième recommandation du Code européen contre le cancer : L'allaitement réduit le risque de cancer chez la mère (Tackoen et al., 2012).

Le lait maternel joue un rôle important dans l'initiation, le développement et la composition du microbiote intestinal des nouveau-nés en raison de la présence de composants prébiotiques. Les connaissances actuelles mettent l'accent sur l'interdépendance des composants du lait maternel, l'ontogenèse de la fonction intestinale, le développement du système immunitaire de la muqueuse intestinale, la colonisation du microbiote intestinal et la protection contre les agents pathogènes. La qualité de ces interactions peut affecter la santé à court et à long terme des nouveau-nés (Hamosh M, 2001).

Les bactéries lactiques ont des propriétés probiotiques et sont utilisées depuis des siècles dans la fermentation et la conservation biologique des aliments, et sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire comme starter dans le processus de fermentation pour répondre à la demande alimentaire croissante des consommateurs. Sans conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes et al., 2010).

Ces micro-organismes produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, (**Dortu et Thonart, 2009**), tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines, qui ont la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes (**Delves-Broughton, 1990**).

Les propriétés bénéfiques des bactéries lactiques sont d'un grand intérêt, dont certaines sont aujourd'hui bien documentées, comme l'amélioration de la digestion du lactose, et d'autres domaines thérapeutiques comme le traitement de la diarrhée (**Draouault et Corthier, 2001**), considérés comme biothérapeutiques pour diverses affections (**Heymann et Heulevin, 2006**).

Dans ce cadre et afin d'apporter plus de connaissances sur la flore lactique, nous sommes intéressées à :

- L'isolement et la caractérisation phénotypique et métabolique des bactéries lactiques présentes dans le lait maternel .
- Évaluer l'effet antagoniste de la flore isolée sur des bactéries pathogènes.

Le présent travail est structuré en 4 chapitres :

- Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique sur la production du lait maternel, composition en molécules bioactives, la flore lactique et son rôle important .
  - Le deuxième chapitre comprend le matériel et les méthodes employées pour atteindre nos objectifs .
  - Le troisième chapitre regroupe les résultats issus, suivi d'une discussion .
- Et enfin, nous terminerons par une conclusion et des perspectives d'étude.

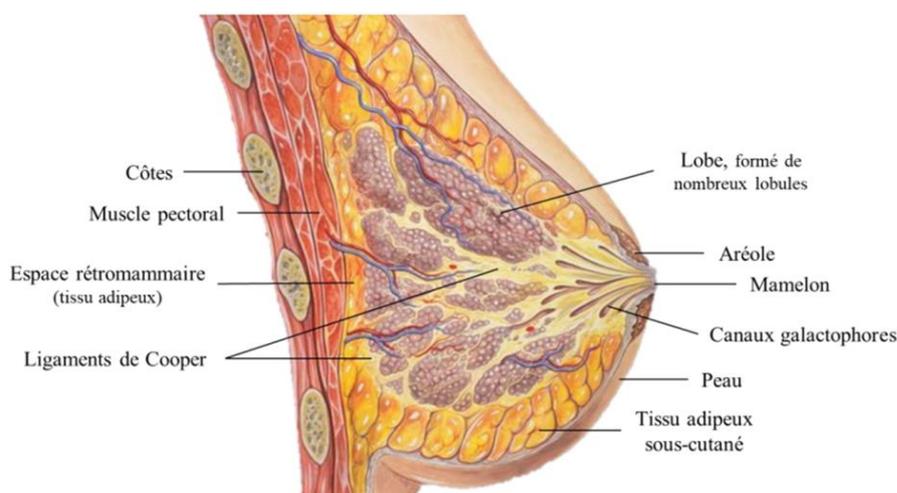
## Synthèse bibliographique

### II. Le lait maternel

La composition du lait maternel est complexe. Elle a évolué depuis des millénaires afin de nourrir et protéger au mieux l'enfant pendant le développement de son cerveau, de son système immunitaire, et pendant la période de croissance la plus rapide de la vie post-natale (Sevrin *et al.*, 2017). La composition du lait humain est très variable et change en réponse à de nombreux stimuli afin notamment de s'adapter à l'âge et aux besoins du bébé (Sevrin *et al.*, 2019).

#### II.1 Anatomie descriptive de la glande mammaire

Les seins sont situés dans la partie supérieure avant la cage thoracique, de part et d'autre du sternum, devant les muscles pectoraux, dans l'espace entre les 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> côtes (Schlein, 2000 ; Payankulam, 2019). Bien qu'elle soit très variable, la forme du sein est généralement hémisphérique, d'environ 12 cm de haut et de large, et le poids varie de 200 grammes pour une jeune fille à 900 grammes pour une femme allaitante. Les variations de taille sont principalement dues à des différences de volume de tissu adipeux plutôt qu'à l'épithélium glandulaire. Le tissu mammaire est constitué de parenchyme (épithélium glandulaire) et d'un stroma constitué de tissu conjonctif et adipeux. L'épithélium glandulaire représente 15 à 50 % du volume mammaire chez les femmes qui n'allaitent pas (fig .1) (Schlein *et al.*, 2000 ; Rhodes *et al.*, 2013).



**Figure 1** : Schéma d'une coupe transversale du sein montrant ses différentes structures (Steffensen *et al.*, 2004)

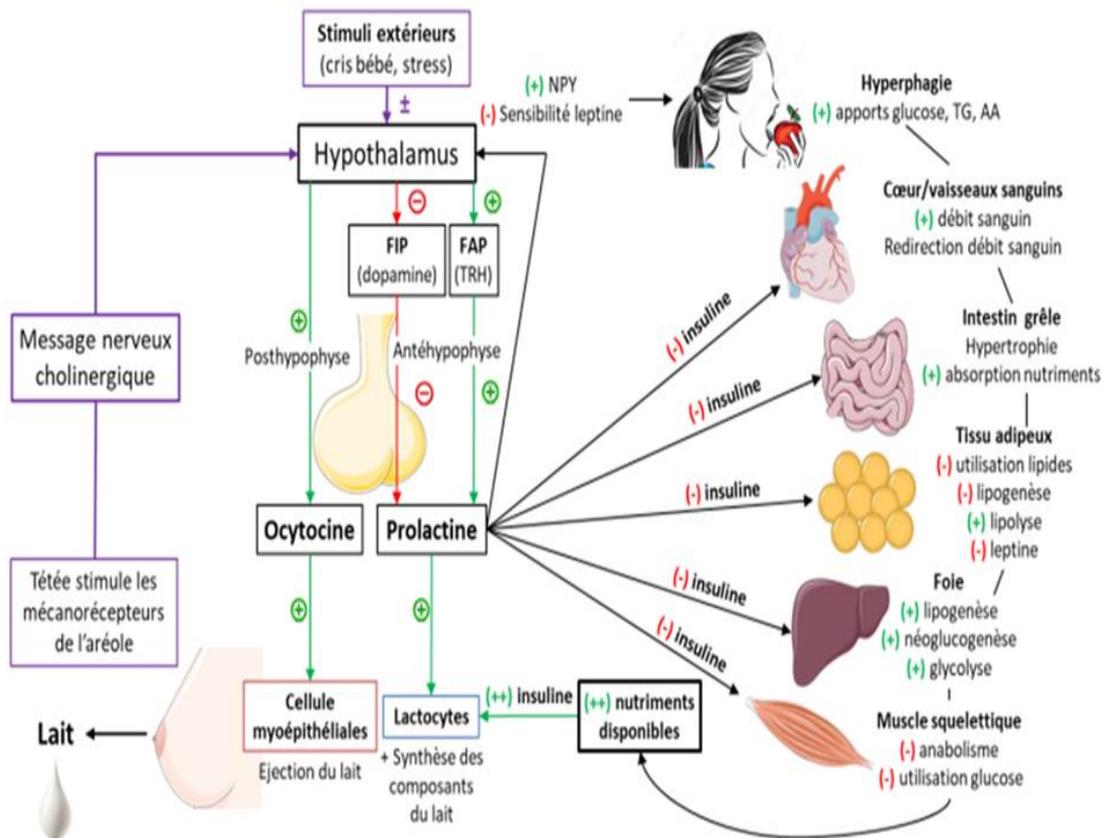
## II.2. La production de lait maternel

La production de lait maternel commence pendant la grossesse et culmine à la naissance du bébé. L'allaitement va former un réseau vital de capillaires dans le sein, qui sert ensuite à transporter tous les éléments qui composent le lait maternel (eau, lipides, glucides, protéines, etc) vers les cellules productrices.

Pendant le travail, le placenta est expulsé, la production d'hormones de grossesse (fig .2) s'arrête cèdent alors la place à une autre hormone produite dans le cerveau, la prolactine qui assure la synthèse et le stockage du lait immédiatement après l'accouchement, la mère produit du colostrum dans chaque sein, la montée du lait se produira dans les prochains jours. La quantité de lait maternel dépend principalement des besoins du bébé .

La production de lait est influencée par les hormones (principalement la prolactine et l'ocytocine) et les réflexes ; La succion du bébé sur le mamelon stimulera l'hypophyse antérieure du cerveau pour produire de la prolactine, qui agira sur les alvéoles pour sécréter du lait. Ce mécanisme est parfois appelé « réflexe lactique » (*Guide de l'Allaitement maternel, 2013*).

Pendant les trois premiers jours de l'allaitement, le lait maternel (colostrum) a une composition différente du lait mature ; Plus faible en lipides et en lactose, plus faible en densité énergétique (450-480 contre 13 g/L) et en protéines (22 contre 11 g/L). Des protéines solubles fonctionnelles telles que les immunoglobulines, notamment les IgAs, la lactoferrine, divers facteurs de croissance (G-CSF, EGF, IGF1) diverses cytokines, tandis que la caséine est quasiment absente. Tous ces facteurs contribuent à protéger les nouveau-nés qui sont particulièrement vulnérables aux infections. Au bout de quelques jours, la composition atteint celle du lait mature, et c'est grâce à cette capacité d'adaptation aux besoins de l'enfant que le lait maternel est le mode d'alimentation préconisé par les pédiatres dans les premières semaines de vie (*Janlou Chaput Futura, 2013*).



**Figure 2** : Voies neuro-hormonales de régulation de la production de lait (Thomas, 2020)

NPY : neuropeptide Y ; FIP : facteur inhibiteur de la prolactine ; FAP : facteur activateur de la prolactine ; TRH : thyrotrophin releasing hormone ; TG : triglycérides ; AA : acides aminés libres ; - insuline : diminution de l'apport d'insuline causée par une hypoinsulinémie et une résistance à l'insuline des tissus périphériques ; ++ insuline : augmentation des apports en insuline due à une forte augmentation de l'insulino-sensibilité du tissu mammaire.

### II.3 Composition de lait maternel

Le lait est un aliment fonctionnel dans lequel sont retrouvés l'ensemble des nutriments essentiels au développement du nouveau-né. Selon les espèces de mammifères, des variations substantielles existent dans la concentration et la composition en macronutriments du lait (protéines, glucides et lipides), ainsi que dans la composition en micronutriments et composés

bioactifs. Le lait maternel contient essentiellement de l'eau (90%). La concentration des macro- et micronutriments évolue au cours de la lactation et se stabilise autour de 10 g/dL dans le lait mature (Sevrin *et al.*, 2017).

### II.3.1 Composition en macronutriments du lait humain

Si la composition en macronutriments connaît d'importantes variations à l'échelle individuelle et au cours de la lactation, à l'échelle de la population globale, elle reste bien conservée et ce, quelles que soient les variations de statut physiologique de la mère (Rodel *et al.*, 2008).

#### a/ Les protéines

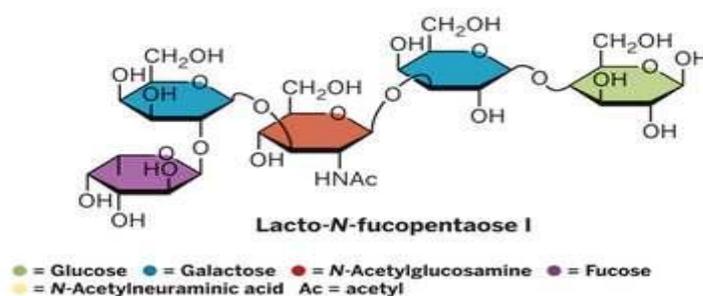
Sont la fraction la plus représentée dans le lait humain : La teneur en protéines du lait de femme est comprise entre 0.8 et 1.2 g pour 100 ml, est nettement inférieure à celle des autres mammifères. Néanmoins, elle est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson en raison d'une excellente absorption et d'une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés. Les protéines sont constituées essentiellement par les caséines 30 % (présentes à un faible taux dans le lait maternel) et les protéines solubles 70 % (protéines qui ne précipitent pas avec les caséines, elles se composent essentiellement d'immunoglobulines et des lysozymes, intervenants indispensables dans les défenses immunitaires du nourrisse) (Picciano MF, 2001). Les protéines fournissent, après hydrolyse lors de la digestion, des peptides et des acides aminés libres qui sont absorbés et incorporés dans les protéines corporelles du nouveau-né ou jouent des rôles clés dans la régulation de voies métaboliques. Cependant, certaines protéines sont également retrouvées intactes au niveau de l'intestin du nouveau-né et sont absorbées en ayant gardé toutes leurs propriétés bioactives. Celles-ci vont alors jouer de nombreux rôles comme le transport (protéine de liaison du folate) et la digestion d'autres nutriments (amylases, lipases), la maturation intestinale (facteurs de croissance), ou avoir une action sur le système immunitaire (immunoglobulines) et une activité antimicrobienne (lysozyme, lactoferrine et mucines). L'action bioactive de ces protéines est largement impliquée dans les effets bénéfiques de l'allaitement maternel (Bahamni, 2016 ; Murase *et al.*, 2017).

## **b/ Les lipides**

Représentent la source d'énergie majeure du lait avec environ 45% des apports énergétiques totaux. Ils sont majoritairement sécrétés sous forme de triglycérides qui représentent 98% des lipides totaux, les 2% restants sont composés de mono et diglycérides, de phospholipides, d'acides gras libres et de cholestérol (Murase et al., 2017 ; Bahmani et al., 2016) ; La teneur en lipides et en énergie du lait maternel augmente avec la durée de la lactation. Elle varie également selon l'état nutritionnel de la mère. Les lipides du lait de femme ont une teneur proche de celle du lait de vache, mais ils ont une digestibilité supérieure, d'une part du fait de la présence d'une lipase et riche en acide docosahexaénoïque, dont les rôles au niveau rétinien et cérébral sont bien démontrés (Murase et al., 2017 ; Rodel et al., 2008).

## **c/ Les glucides**

Représentent la fraction la plus importante du lait humain (tab 1). Le principal glucide du lait est le lactose (environ 6,5 g/dL). Sa concentration dans le lait maternel est la plus élevée de tous les mammifères, ce qui pourrait représenter une adaptation à la forte demande en énergie du cerveau humain (Murase et al., 2017). Le lactose est également le principal composé osmotique du lait qui régule l'entrée d'eau dans la cellule mammaire (Mahgoub et al., 2016). Ainsi, bien que sa concentration soit très stable, une augmentation de la production de lait est généralement associée à une augmentation de la concentration en lactose. Contrairement à d'autres espèce (vache, rat) (Rodel et al., 2008). Chez l'homme d'autres glucides sont également présents en quantités significatives : ce sont les oligosaccharides du lait humain (OLH ou HMO, Human Milk Oligosaccharides). Ces sucres ont démontré leur rôle dans la mise en place de l'écosystème bactérien colique et dans la protection des infections digestives (fig.3) (von Dreele, 1988).



**Figure 3 :** Exemple d'oligosaccharide du lait humain.

### II.3.2 Composition en micronutriments du lait maternel

Le lait maternel permet un apport équilibré de vitamines et minéraux à l'enfant, Le lait humain contient beaucoup moins de minéraux que le lait de vache, ce qui, associé à une teneur également relativement faible en azote, permet de limiter la charge osmotique rénale à des valeurs beaucoup plus faibles pour le lait maternel (93 mOsm/l pour le lait maternel versus 221 mOsm/l pour le lait de vache).

Les concentrations en fer, en cuivre et en zinc du lait maternel diminuent progressivement au cours de la lactation. Le fer du lait maternel est bien absorbé (avec un coefficient d'absorption de 50 %), 5 fois mieux que celui du lait de vache.

Les concentrations en calcium, phosphore et magnésium sont étroitement régulées et indépendantes du statut maternel, l'absorption du calcium du lait maternel est très élevée (60 % versus 25 % du calcium du lait de vache) et d'autre part le rapport calcium/phosphore y est meilleur (2,2 versus 1,2 pour le lait de vache). La concentration en chlore, sodium et potassium reste très faibles quand la lactation est établie.

La composition en vitamines du lait maternel dépend du statut maternel en vitamines ou de ses apports alimentaires. Généralement, il existe un possible déficit en vitamine B12 ; peu de vitamine K, un taux faible eu vitamine D, tandis que le vitamine C est la plus abondante (3,8 mg/dL) suivi des vitamines E, B5, B3 et B1 (180 à 350 µg /dL) et A (tab.1) ([Tackoen et al., 2012](#)).

**Tableau 1** : Composition en nutriments et en composés bioactifs du lait humain mature. (Rodel, 2008 ; Martin, 2014 ; Bahmani, 2016 ; Murase, 2017).

Composition	Quantité (g/dL)	Principaux constituants	Fonctions
Eau	88 - 91	Eau	Hydratation ; solubilisation des composés essentiels ; facilite l'absorption des nutriments
<b>Macronutriments</b>	10 - 11		
Protéines	0,9 - 1,2	Caséines (13-30%) Protéines sériques (60-75%) : $\alpha$ -lactalbumine, lysozyme, Igs (IgA > IgG), lactoferrines Mucines (< 20%)	Apport des acides aminés essentiels à la synthèse protéique ; facilitent la digestion ; protection contre les infections ; développement du système digestif
Glucides	6,7 - 7,8	Lactose (6,5-7,0 g/dL) OLH (0,8-1,3 g/dL)	Apport d'énergie (cerveau) ; entrée de l'eau dans la cellule ; développement du microbiote intestinal et du tractus digestif ; protection contre les infections
Lipides	3,2 - 3,6	Triglycéride (98% des lipides) AGS (35-40%) : Acide Palmitique (~24%) AGMI (45-50%) : Acide Oléique (~36%) AGPI (15-20%) : Acide Linoléique (9-11%) Acide $\alpha$ -linoléique (1-3%) DHA (~0,35%)	Principal apport d'énergie ; fonction membranaire ; favorisent la croissance ; le développement du cerveau, de l'immunologie et du tractus digestif ; protection contre les infections bactériennes  Importance de la localisation des AG sur le glycérol pour la biodisponibilité
<b>Micronutriments</b>	0,2 - 0,3		
Vitamines	~ 0,05	Vitamines C, E, B5, B3...	Cofacteurs métaboliques essentiels au développement du nouveau-né
Minéraux	~ 0,15	Calcium, potassium, sodium, phosphore, chlore...	Attention aux apports maternels en vitamines B, A, C, D, K et en iode
<b>Composés bioactifs</b>			
Azote non protéique	~0,3	Urée, créatine, nucléotides, acides aminés libres, peptides (25% de l'azote total)	Modulation des activités enzymatiques et métaboliques ; développement du tractus digestif et de la fonction immunitaire ; apports de bases à la synthèse de macromolécules
Facteurs de croissance		EGF, IGFs, NGF, VEGF, EPO	Promotion de la croissance des entérocytes, des neurones entériques, des vaisseaux sanguins, des hématies...
Facteurs immunologiques		Leucocytes (macrophages et lymphocytes) ; Igs (IgA) ; cytokines pro et anti-inflammatoires (IL, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ )	Protection contre les infections ; activation de la réponse immunitaire, réparation cellulaire, action anti-inflammatoire
Enzymes		Amylases, lipases, protéases	Favorise la dégradation des macronutriments.
Hormones		Insuline, ghréline, leptine, adiponectine	Modulation du métabolisme énergétique et de la composition corporelle
miARN		miR181, miR155, miR92, miR124...	Facteurs de régulation métabolique ; favorisent la prolifération et la réponse immunitaire
Probiotiques		> 200 espèces bactériennes	Mise en place d'un microbiote intestinal sain

Igs : immunoglobuline ; OLH : oligosaccharides du lait humain ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras mono-insaturés ; AGPI : acides gras poly-insaturés ; DHA : acides docosahexaénoïque EGF : facteur de croissance épidermique ; IGF : facteur de croissance

semblable à l'insuline ; NGF : facteur de croissance neuronal ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; EPO : érythropoïétine ; IL : interleukine ;  $TNF\alpha$  : facteur de nécrose tumorale ;  $TGF\beta$  : facteur de croissance transformant ; miR : micro-ARN

### II.3.3 Composition en composés bioactif

Les composés bioactifs du lait proviennent de diverses sources. Ils peuvent être directement sécrétés par les cellules lactières ou présentes dans le lait (épithélium leucocytaire), passés directement du sang maternel dans le lait par transcytose, et même présents au niveau de la membrane des globules graisseux. Dans tous les cas, ces composés agissent directement sur le bébé en modulant les voies métaboliques qui affectent certaines fonctions de son corps et donc sa santé (Hamosh, 2001).

Les nouveau-nés ont besoin de protection de lutte contre les agents pathogènes est également une source de régulation immunitaire exogène, le lait maternel contient une gamme impressionnante de facteurs bioactifs faire de lui la plus riche source de protection immunomodulateur (Hasselbalch, 1996) (fig.4).

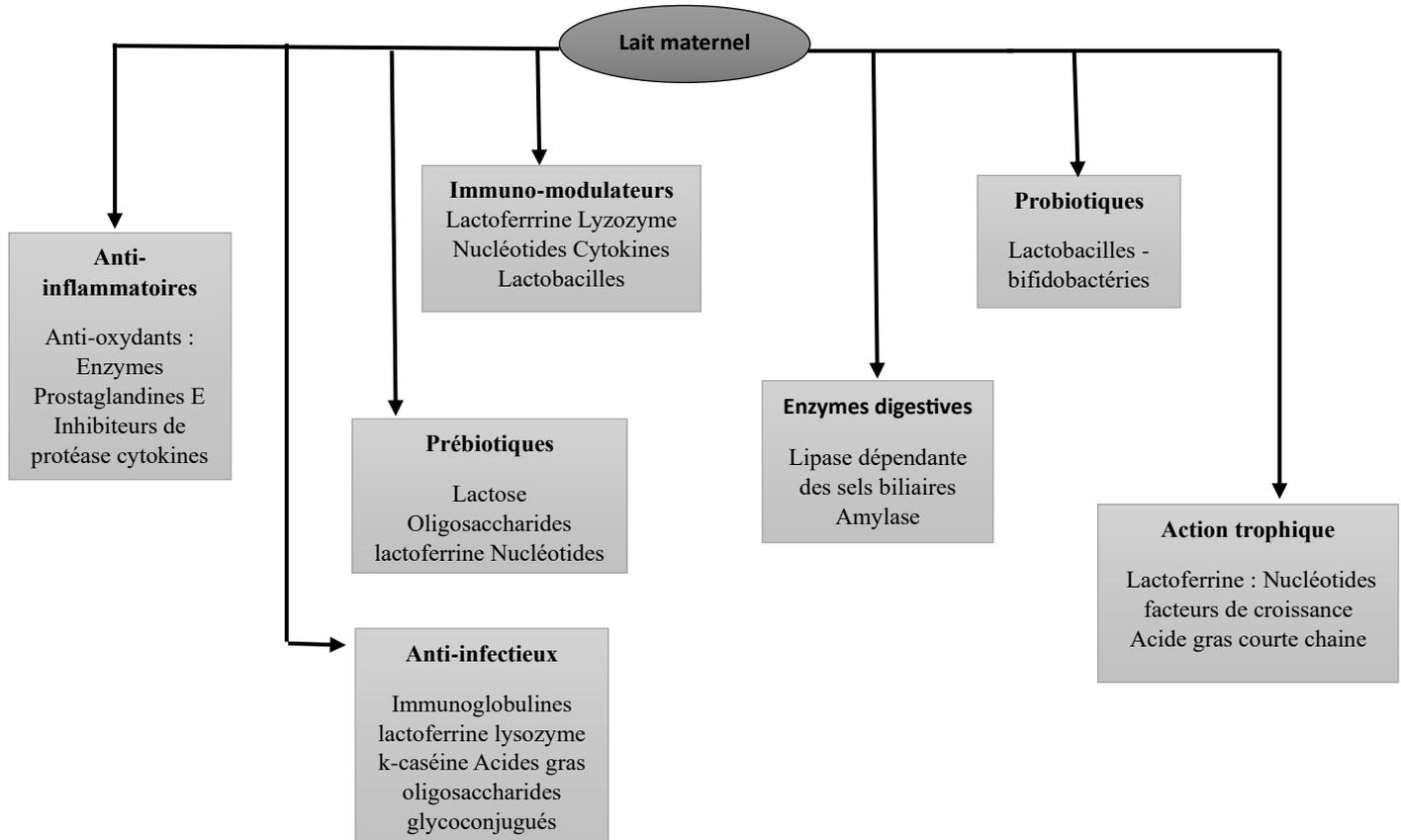
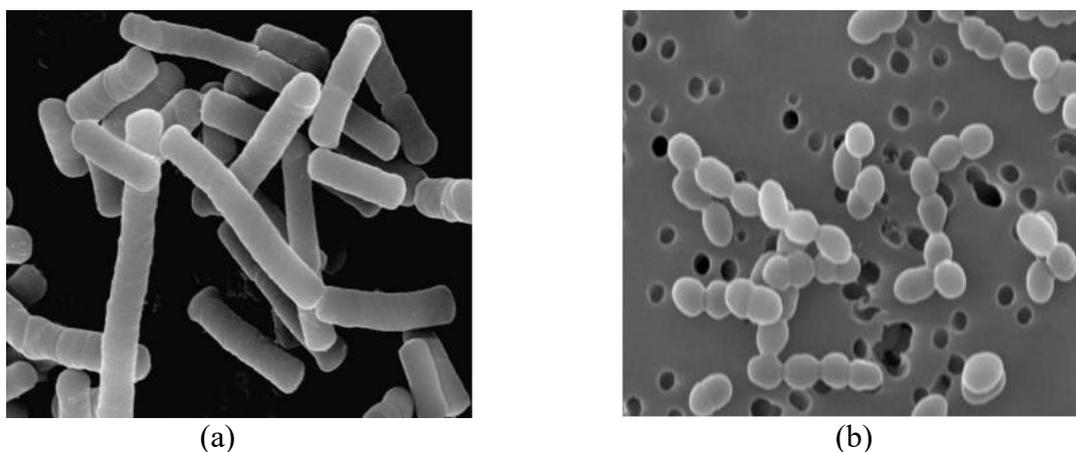


Figure 4 : composants protecteurs du lait maternel

### III. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de micro-organismes qui produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Ils ont colonisé beaucoup d'aliments et font partie de la flore intestinale et vaginale de l'homme ou de l'animal. Le groupe *Lactobacillus* rassemble plusieurs genres morphologiquement distincts (fig. a et b) qui partagent une capacité commune à fermenter le lactose par la production d'acide lactique (Boumediene, 2013). Ils montrent également systématiquement des effets bénéfiques sur l'équilibre de la flore intestinale et la santé globale (Bouguerra, 2020).



**Figure 5 :** Observation au microscope électronique (x10000) de : (a) *Lactobacillus Rosell-11* ;(b) *Leuconostoc lactis*.

#### III.1. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes, à Gram positif, immobiles, asporulantes, micro aérophiles ou anaérobies, catalase négative, oxydase négative, acidotolérantes, non motiles, de forme coccoïde ou bâtonnet. Le glucose est fermenté par ces bactéries pour la production de l'acide lactique comme un produit principal final.

À l'exception de quelques espèces, les membres des BL sont des organismes non pathogènes (Reddy *et al.*, 2008 ; Papadimitriou *et al.*, 2016). Ils ont de multiples besoins nutritionnels (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Gevers., 2002).

Ces bactéries sont capables de se développer à des températures comprises entre 10°C et 45°C. La plage de pH est de 4,0 à 4,5 (tab .2). Leur division se produit sur un seul plan, à l'exception des genres suivants : *Pediococcus*, *Aerococcus* et *Tetradococcus*. (Ababsa, 2012).

**Tableau 2** : Quelques caractéristiques des bactéries lactiques.

Caractéristiques	Bacilles				Coques			
	Carnobacterium	Lactobacillus	Aerococcus	Enterococcus	Lactococcus Vagococcus	Leuconostoc Oenococcus	Pediococcus	Streptococcus
Formation des tétrades								
Production de gaz <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	±	+	+	±	+	-	-
Croissance à 10°C	-	±	-	+			±	
Croissance à 45°C		±			-	-	±	±
Croissance dans 6.5% NaCL	ND <sup>d</sup>	±	-	-	-	±	±	-
Croissance dans 18% NaCL			-	+	-	-	±	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	+	+	±	±		-
Croissance à pH 9,6					-	-	-	
Acide lactique	L	D,L,DL <sup>e</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>e</sup>	L

**Notes :**

+ : Positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

<sup>a</sup> *Weissella* peuvent être également sous forme de bacille.

<sup>b</sup> Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

<sup>c</sup> Faible quantité de CO<sub>2</sub> produite selon le milieu.

<sup>d</sup> Peut ne pas se développer dans 8% NaCL.

<sup>e</sup> Production d'acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les es

**III.2 Habitat**

Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, végétaux (plantes et fruits), animaux et humains. Mais certaines espèces semblent être adaptées à des milieux spécifiques et se retrouvent rarement en dehors de leur habitat naturel. Il convient également de noter que les bactéries lactiques font partie de la flore microbienne naturelle de la bouche, de l'intestin et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux homéothermes. Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles ou avec l'hôte.

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*. De plus, l'appareil reproducteur féminin est principalement constitué de bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite. De plus, Les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle important dans la technologie alimentaire (Bougaddima et al., 2019).

### III.4 Classification

Les bactéries lactiques se divisent en différents genres selon la morphologie, croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit et la tolérance aux fortes concentrations en sel et aux acides ou bases et le mode de fermentation de glucose. Des marqueurs chimiotaxonomiques tels que la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire sont également utilisés dans la classification (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales* qui comprend 6 familles (tab.3) : *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Aerococcaceae*. Ces familles comprennent 38 genres dont 10 considérés comme les plus associés aux aliments : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* et *Weissella*. Actuellement, il existe plus de 400 espèces lactiques avec plus d'une centaine chez *Lactobacillus* qui est considéré comme le genre le plus large (Vandamme et al., 2014 ; Papadimitriou et al., 2016).

Tableau 3 : Présentation des espèces des bactéries lactiques a , b (Bouguerra, 2020).

Familles	Genres	Espèce type	Nombre des espèces
<b>Aerococcaceae</b>	<i>Abiotrophia</i>	<i>Ab. defectiva</i>	1
	<i>Aerococcus</i>	<i>Ae. viridans</i>	7
	<i>Dolosicoccus</i>	<i>Dc. paucivorans</i>	1
	<i>Eremococcus</i>	<i>Ere. coleocola</i>	1
	<i>Facklamia</i>	<i>F. hominis</i>	6
	<i>Globicatella</i>	<i>Glo. sanguinis</i>	2
	<i>Ignavigranum</i>	<i>Ig. ruoffiae</i>	1
<b>Carnobacteriaceae</b>	<i>Alkalibacterium</i>	<i>Alk. olivapovliticus</i>	9
	<i>Allofustis</i>	<i>Af. seminis</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	<i>Ai. otitis</i>	1
	<i>Atopobacter</i>	<i>Ap. phocae</i>	1
	<i>Atopococcus</i>	<i>Ac. tabaci</i>	1
	<i>Atopostipes</i>	<i>At. suicloacalis</i>	1
	<i>Bavariicoccus</i>	<i>B. seileri</i>	1
	<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i>	10
	<i>Desemzia</i>	<i>D. incerta</i>	1
	<i>Dolosigranulum</i>	<i>Dg. pigrum</i>	1
	<i>Granulicatella</i>	<i>Gra. adiacens</i>	3
	<i>Isobaculum</i>	<i>Is. melis</i>	1
	<i>Lacticigenium</i>	<i>Lg. naphthae</i>	1
	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M. psychrotolerans</i>	2
	<i>Trichococcus</i> (incl. <i>Lactosphaera</i> )	<i>Tr. flocculiformis</i>	5
		<i>Cat. marimammalium</i>	1
<b>Enterococcaceae</b>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	43
	<i>Melissococcus</i>	<i>Me. plutonius</i>	1
	<i>Pilibacter</i>	<i>Pi. termitis</i>	1
	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Tet. halophilus</i>	5
	<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i>	8
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	151
	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Pl. selangorensis</i>	1
	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped. damnosus</i>	11
<b>Leuconostocaceae</b>	<i>Fructobacillus</i>	<i>Fru. fructosus</i>	5
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	13
	<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>	2
	<i>Weissella</i>	<i>W. viridescens</i>	15
<b>Streptococcaceae</b>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>	7
	<i>Lactovum</i>	<i>Lv. miscens</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	78
<b>D'autres 'LAB'</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. bifidum</i>	41

### III.4. Bactéries lactiques et lait maternel

Le lait maternel est une source de micro-organismes qui préviennent les maladies et améliorent l'efficacité du système digestif. C'est un facteur important dans l'initiation, le développement et la composition du microbiote intestinal néonatal. « 1 »

Les faits ont prouvé que les bébés peuvent acquérir environ  $10^5$  à  $10^7$  bactéries en ingérant 800 ml de lait maternel par jour. Parmi eux, les BL constituent une partie importante de la flore intestinale. Les bactéries lactiques présentes dans le lait maternel peuvent jouer plusieurs rôles, comme réduire l'incidence et la gravité des infections intestinales néonatales en inhibant la croissance d'un large spectre de bactéries pathogènes. « 2 »

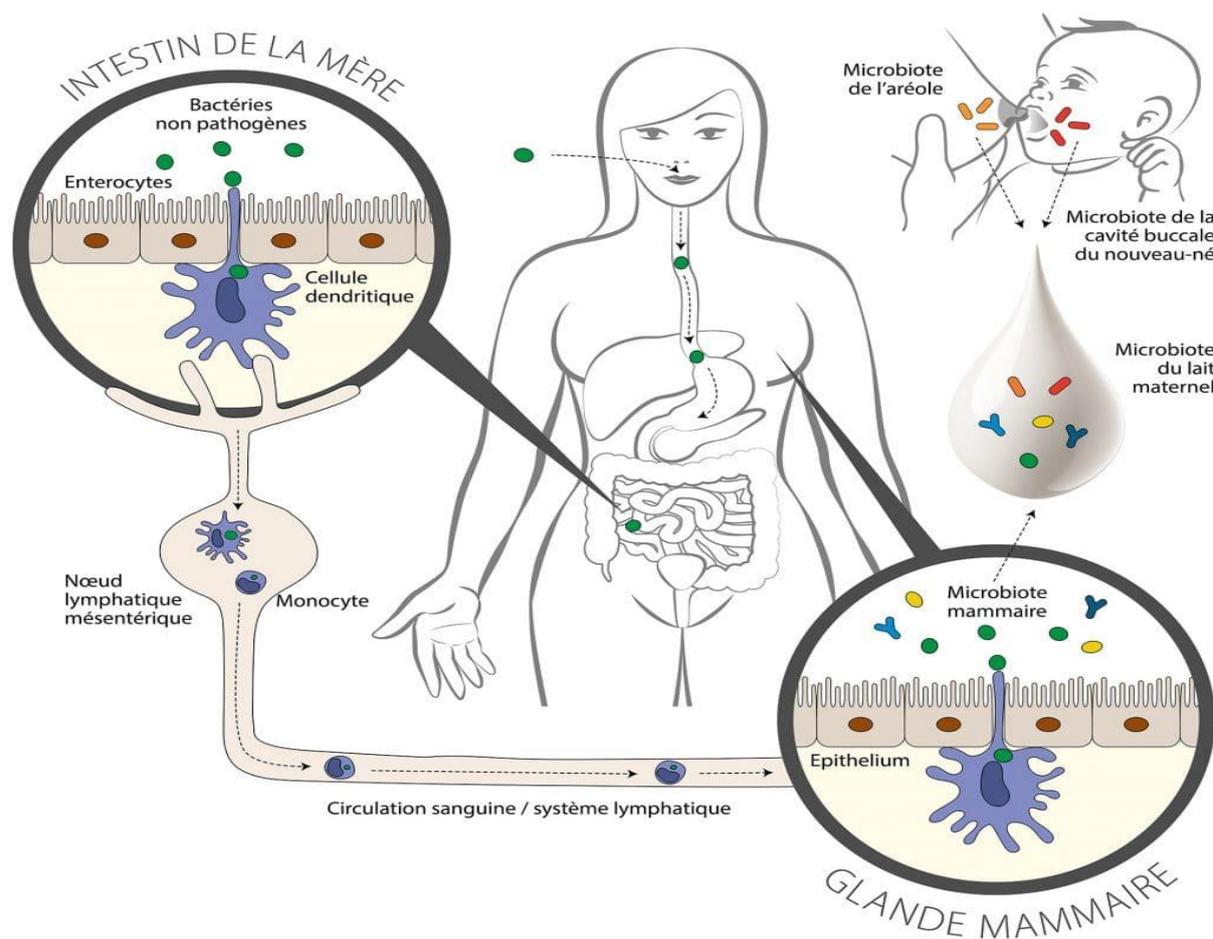
Il existe un bactériome du lait maternel de base composé de neuf genres bactériens, dont *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* et *Bradyrhizobium* (Matib et al., 2020).

#### III.4.1. Leur Origine dans le lait maternel

Le mécanisme exact par lequel les bactéries atteignent la glande mammaire fait l'objet de débats depuis de nombreuses années.

On pense traditionnellement que les bactéries présentes dans le lait maternel sont acquises par contamination cutanée ou orale. Ceci est cohérent avec l'observation selon laquelle *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (communément trouvés sur la peau des adultes) ont été trouvés dans le lait (Martín et al., 2012; Ruiz et al., 2019). En revanche, un examen détaillé du lait maternel et de la peau maternelle a révélé que les bifidobactéries et les lactobacilles trouvés dans le lait maternel n'étaient pas présents sur la peau maternelle (Martin et al., 2009). Considérant également que les bifidobactéries sont strictement anaérobies, il est peu probable qu'elles survivent sur la peau. Ces résultats suggèrent que les bactéries viables de l'intestin maternel sont transmises à la glande mammaire via une voie endogène grâce à la présence de la voie entéro-mammaire (Rodríguez, 2014). Le transfert bactérien de l'intestin maternel vers la glande mammaire implique des interactions complexes entre les cellules épithéliales, les cellules immunitaires et les bactéries. Les preuves à l'appui de cette voie comprennent la présence de communautés bactériennes dans le colostrum prélevé avant la première tétée des nourrissons (Damaceno et al., 2017).

Le mécanisme de translocation physiologique implique des cellules immunitaires, des cellules dendritiques et des cellules CD18 qui transportent des bactéries non pathogènes de la lumière intestinale vers la glande mammaire en lactation. Les cellules dendritiques accèdent aux entérocytes en ouvrant des jonctions serrées entre les entérocytes et en absorbant les bactéries de la lumière intestinale (fig.6). Les bactéries sont ensuite transportées par les macrophages vers les ganglions lymphatiques mésentériques et éventuellement vers la glande mammaire (Fernández *et al.*, 2013; de Andres *et al.*, 2018). Plus tard au cours de la grossesse et de l'allaitement, les translocations se produisent plus fréquemment en raison de changements dans la régulation des jonctions serrées intestinales, entraînant un flux de cellules immunitaires vers la glande mammaire (Fernández *et al.*, 2013).



**Figure 6 :** Origine de l'enrichissement microbien du lait maternel "voie oro entéro /mammaire" et "transfert rétrograde"

En parallèle, les spécialistes ont noté que le mode d'accouchement, l'âge gestationnel, le sexe du bébé, la prise d'antibiotiques pendant la grossesse ou le stade de l'allaitement ont un effet sur la flore contenue dans le colostrum. De même, celle-ci peut également différer en fonction de l'alimentation de la mère, de son indice de masse corporel (IMC), de la composition du lait en macronutriments, d'une infection au VIH mais aussi selon la situation géographique et la technique employée pour allaiter . « 1 »

#### III.4.2. Rôle du microbiote du lait maternel dans l'intestin du nourrisson

Les bactéries du lait maternel jouent un rôle immédiat et à long terme dans la réduction de l'incidence et de la gravité des infections bactériennes chez les nourrissons allaités par de multiples mécanismes. Les bactéries commensales peuvent exclure ou exprimer des propriétés antimicrobiennes par rapport aux bactéries pathogènes. Par exemple, il a été démontré que les lactobacilles isolés du lait maternel inhibent l'adhésion et la croissance des pathogènes gastro-intestinaux, y compris les souches *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Pseudomonas spp* et *Salmonella spp* (Heikkila MP et al, 2003). L'administration d'une souche de lactobacilles dans le lait maternel dans le cadre d'un essai contrôlé chez les nourrissons âgés de 6 à 12 mois a réduit l'incidence des infections gastro-intestinales, respiratoires et totales de 46, 27 et 30 %, respectivement. Une autre étude a révélé que 30 % du lait maternel contient des bactéries productrices de nisine qui peuvent survivre au passage dans l'intestin. La nisine est une bactériocine employée par l'industrie laitière pour prévenir la germination des spores et inhiber *Clostridium botulinum* et *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus salivarius*. Le lait maternel possède également une activité antimicrobienne contre le staphylocoque doré pathogène (Lyons A, 2010).

Un ensemble croissant de données probantes sur les animaux indique le rôle instrumental du microbiote dans le développement et l'éducation du système immunitaire. Il a été démontré que les souches de *Lactobacillus* améliorent la production de macrophages des cytokines Th1, y compris IL-2, IL-12 et TNF-alpha. Une étude humaine précoce a suggéré de meilleures réponses au Th1 chez les enfants allaités que chez les enfants nourris au lait maternisé avec des effets immunomodulateurs au-delà du sevrage (Le Doare et al., 2018).

## IV. Les probiotiques

Le terme probiotique a vu le jour en 1965 par opposition aux antibiotiques. Il a été défini par Lilly et Stillwell comme des facteurs dérivés de micro-organismes et stimulant la croissance des autres micro-organismes (Dolié, 2018). Selon la définition adoptée par l’OMS et la FAO en 2002, probiotiques sont définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu’ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l’hôte », par l’induction des changements dans la composition et/ou l’activité de la microflore gastro-intestinale. Ce sont principalement des bactéries et des levures présentes dans l’alimentation ou encore dans les compléments alimentaires sous forme lyophilisée (Guarner, 2011). Parmi les genres bactériens couramment utilisés, on retrouve *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, (WHO;FAO, 2002). Son rôle réside dans l’établissement d’une barrière limitant la colonisation par les pathogènes, la participation aux fonctions métaboliques telles que la fermentation des fibres non digestibles. Il participe également à la réduction des infections par l’exclusion concurrentielle et la production de composés antimicrobiens (Fernandez et al., 2013).

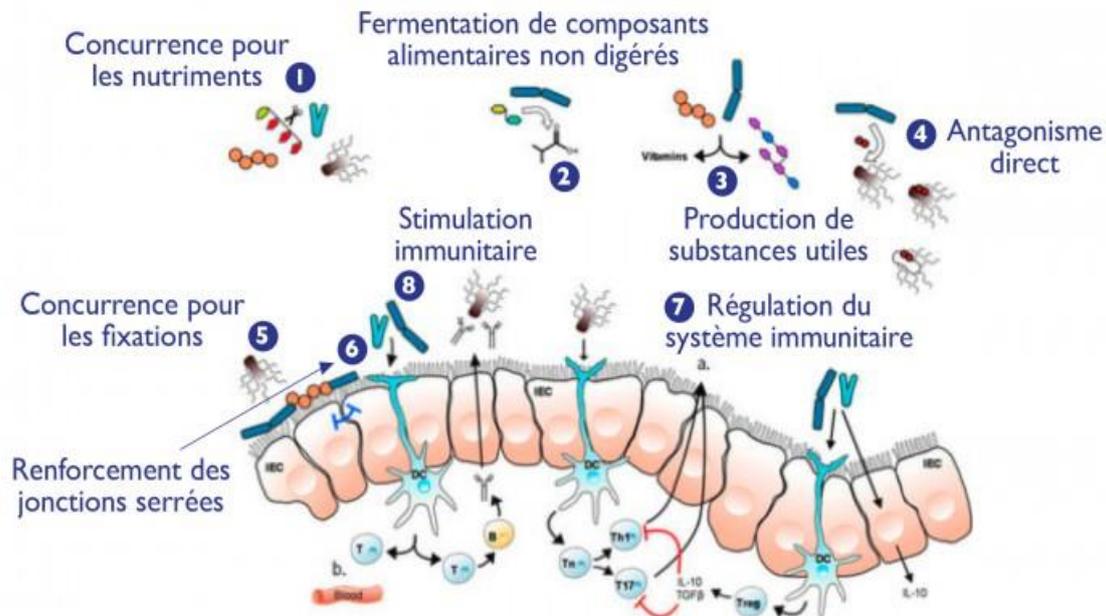
### IV.1. Microorganismes probiotiques

La majorité des micro-organismes probiotiques appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Rubio et al., 2014). Cependant, d’autres micro-organismes peuvent avoir des propriétés probiotiques. Ils comprennent des bactéries des genres *Escherichia*, *Enterococcus* ou encore *Bacillus*, ainsi que des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Rolf, 2000 ; Holzapfel et Schillinger, 2002).

### IV.2. Potentiel probiotique et mécanismes d’action des bactéries lactiques

Les probiotiques ont des effets sur les performances des bébés et leur santé notamment par compétition au niveau de l’utilisation des nutriments, une activité antagoniste, modulation de la virulence des bactéries pathogènes, une stimulation du système immunitaire systémique (Boukhalfi, 2020). ou par autre mécanismes qui sont résumés dans (fig.7)

## Les mécanismes d'action des probiotiques



O'Toole P.W. & Cooney J.C., *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008; 175285.

**Figure 7 :** mécanismes d'action des probiotiques.

### IV.2.1 Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des micro-organismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable (**Fuller, 1991**). Ce facteur détermine la composition du microbiote intestinal. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacille obtenue lors de la consommation de probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation des germes pathogènes (**Oelschlaeger, 2010**).

### IV.2.2 Antagonisme direct

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ceux-ci résultent de la production de différents composés organiques et non-organiques capables d'inhiber ou de limiter la croissance de certains germes pathogènes .

#### IV.2.2.1 Acides organiques

Qu'elles soient homofermentaires ou hétérofermentaires, les bactéries lactiques produisent différents types d'acides organiques. Grâce à cette production, le pH du milieu dans lequel les bactéries lactiques se multiplient diminue, permettant ainsi l'inhibition d'une partie de la flore qui s'y développe et qui pourrait être indésirable dans l'aliment sur le plan hygiénique (Hammi, 2016).

#### IV.2.2.2 Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes (Zalan et al., 2005). En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition, se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (Zalan et al., 2005).

Certaines bactéries lactiques synthétisent la catalase hexamérique ou tétramérique, on parle de pseudocatalases. Celles-ci contiennent du manganèse, ce qui permet de protéger ces bactéries contre leur propre peroxyde d'hydrogène (Strus et al., 2006).

#### IV.2.2.3. Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. En créant un environnement anaérobie, il inhibe les micro-organismes aérobies. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Ammor et al., 2006).

#### IV.2.2.4. Diacétyl

Le diacétyl est un composé aromatique essentiel. Plusieurs bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, peuvent le synthétiser (Leveau, 1991). Sa capacité inhibitrice se manifeste vis-à-vis des levures, des bactéries à Gram-négatif. Les bactéries à Gram-positif non lactiques sont quant-à elles moins sensibles (El-Ziney et al., 1998).

#### IV.2.2.5. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est un métabolite intermédiaire qui possède un effet antimicrobien. Il est produit lors de la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney et al., 1998). La reutéline possède un large spectre d'activité et a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004). Elle interfère avec la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires.

#### IV.2.2.6. Bactériocine

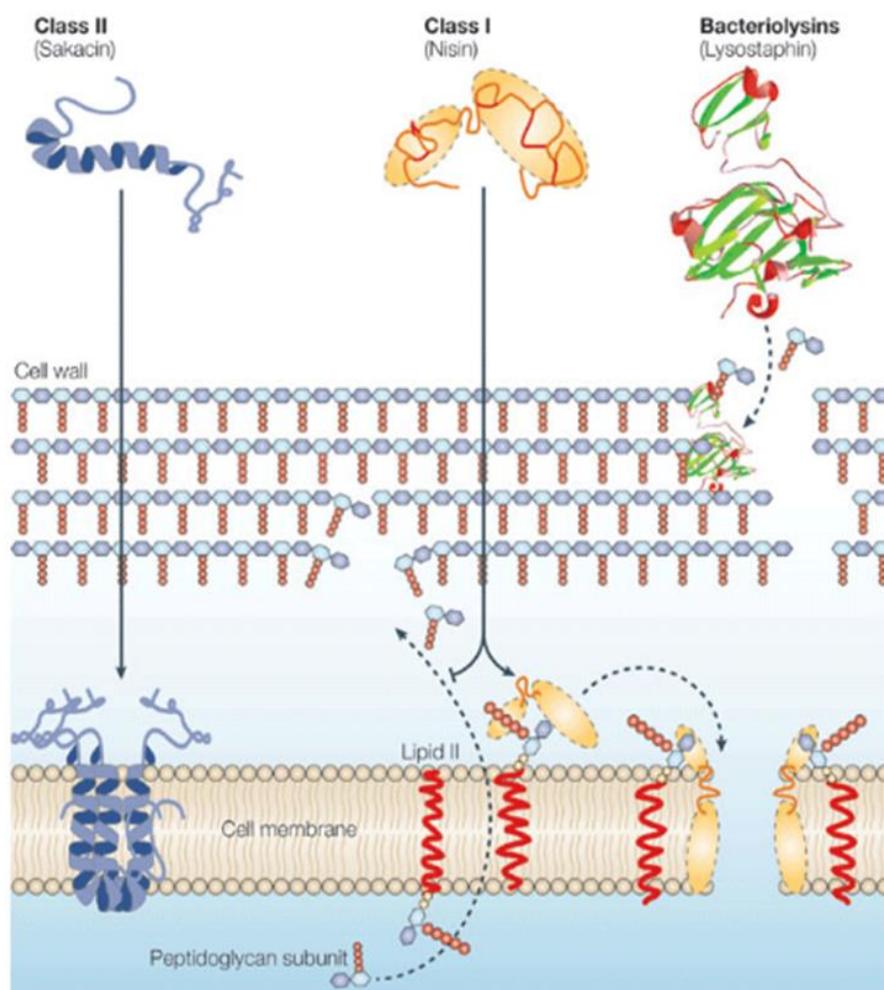
La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines, constituées généralement de 30 à 60 acides aminés, ayant une activité contre un certain nombre d'espèces étroitement ou pas étroitement proches phylogénétiquement de la bactérie. Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez et al., 2007 ; Riley et Chavan, 2007 ; Khalil et al., 2009 ; Tabasco et al., 2009). Généralement, elles ont un effet sur les membranes, la transcription de l'ADN et sur les protéines. Elles représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, (Klaenhammer, 1988), ainsi que par leur origine génétique, leur spectre et mode d'action (BenOmar et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Ruiz-Barba et al., 2010).

Ces substances antagonistes, produites par la plupart des bactéries lactiques, se différencient des antibiotiques du fait qu'elles sont synthétisées au niveau du ribosome et leur spectre d'action est relativement étroit, alors que les antibiotiques sont généralement des métabolites secondaires et possèdent un spectre d'action plus large (Ghraiiri et al., 2008).

##### IV.2.2.6.1 Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009). Les antibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur

de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Gillor *et al.*, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009). L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure  $\alpha$ -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire (Ababsa, 2012).



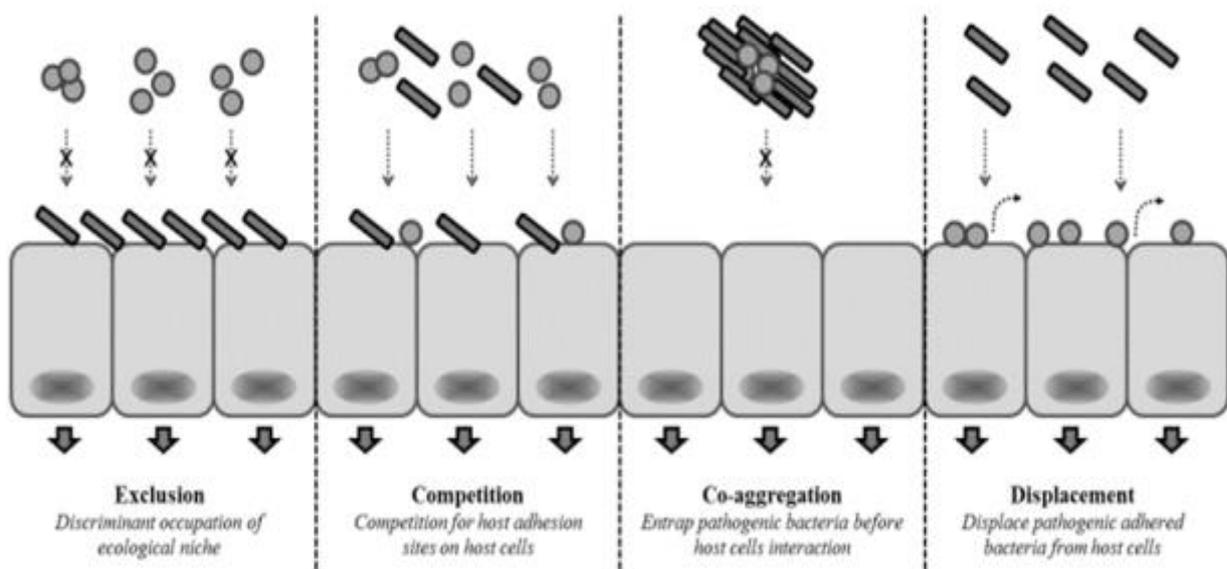
Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Microbiology

**Figure 8** : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (IZQUIERDO, 2009).

### IV.2.3 Modulation de la virulence des bactéries pathogènes

L'utilisation de bactéries lactiques pour combattre les bactéries pathogènes ne repose pas seulement sur la compétition pour la colonisation d'une niche écologique (fig. 9). Outre, cette capacité à bloquer l'adhésion et l'internalisation, les bactéries lactiques ont la capacité de moduler la virulence des souches pathogènes en réprimant l'expression de facteurs de virulences (toxines, enzymes...) ou par la titration directe des toxines sécrétées.

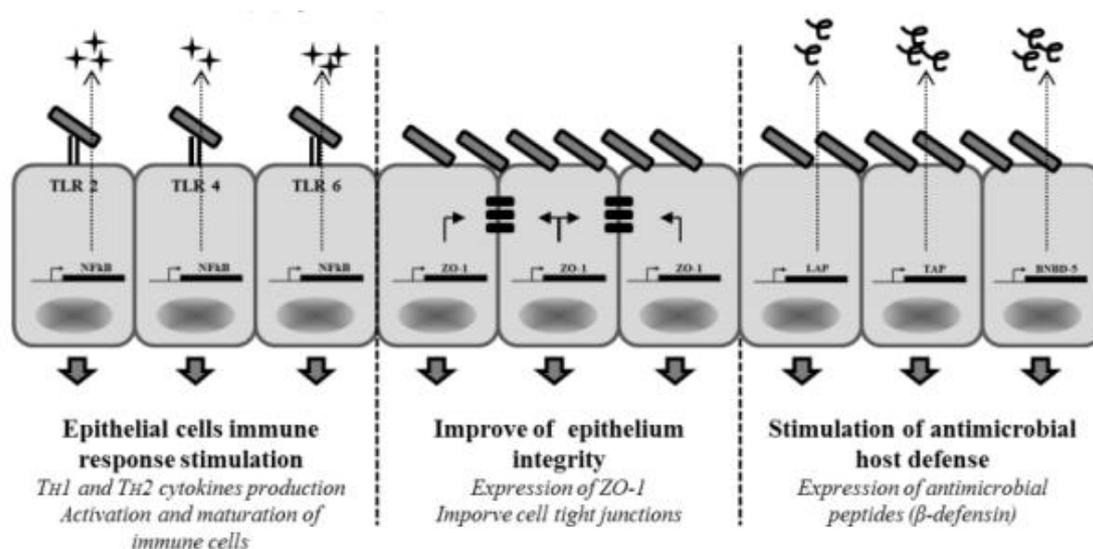
En 2002, Gan et al décrivent l'utilisation d'un probiotique, *L. reuteri* RC-14 pour inhiber les infections causées par *S. aureus* lors d'implants chirurgicaux (Gan et al., 2002). La capacité d'inhibition de *L. reuteri* RC-14 semble liée à sa capacité à sécréter un biosurfactant qui inhibe significativement l'adhésion de *S. aureus* à l'implant. La caractérisation de ce phénomène inhibiteur a permis d'identifier que cette souche entraîne la répression d'une « staphylococcal superantigen-like protein », la SSL11 chez la souche humaine *S. aureus*. Newman. *L. reuteri* RC-14 présente en fait dans son surnageant une molécule capable d'interférer avec le système *agr* (régulateur de gènes accessoires) de *S. aureus* (Novick et al., 1993 ; Yarwood et Schlievert, 2003). La molécule impliquée est un dipeptide cyclique produit par *L. reuteri* et agissant probablement comme molécule de signalisation responsable de cette baisse de la virulence induite par la souche RC-14 (Li et al., 2011).



**Figure 9** : Représentation schématique des différents types de compétition pour une niche écologique entre BL et pathogènes (Bouchard\_Damien, 2013).

#### IV.2.4 Stimulation du système immunitaire systémique

Parmi les allégations santé conférées aux souches probiotiques les propriétés d'immunomodulation des BL sont souvent mises en avant. Ces allégations suscitent de grands intérêts suite au lien établi entre l'altération de la microflore de l'hôte, les maladies autoimmunes et l'émergence des allergies. De nombreuses études relatent le rôle crucial du microbiote dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte et la maturation du système immunitaire chez l'enfant (Reid G, 1999 ; Ouwehand et al., 2002 ; Martin et al., 2004). Chez des individus sains, l'ensemble du système immunitaire est maintenu en homéostasie cependant un déséquilibre entre les acteurs du système immunitaire peut engendrer des maladies. Ces immunopathologies peuvent être de maladies inflammatoires (du tube digestif notamment) font état d'un déséquilibre de la flore microbienne associée à l'organe touché. Les approches basées sur l'utilisation des probiotiques sont aujourd'hui proposées comme une alternative d'immunothérapie tant en utilisation préventive que curative lors d'anomalies ou pathologies immunologiques. Selon la littérature, les probiotiques, grâce à leurs composants intra et/ou extracellulaires, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes mais aussi par interaction avec les épithéliums de l'hôte, qui vont alors modifier la réponse immunitaire de l'organisme (figure 10). On parle alors de capacités immunomodulatrices des probiotiques dont certaines souches peuvent, par exemple, être pro ou anti-inflammatoires, augmentant la résistance aux infections et réduisant aussi les risques d'allergie (Ceslovas et al., 2005).



**Figure 10 :** Représentation schématique de l'impact des BL sur les cellules épithéliales de l'hôte (Bouchard damien, 2013).

Autres effets bénéfiques de BL sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4** : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés) (Izquierdo Alegre, 2009).

Effet des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la $\beta$ -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaire par diminution de la perméabilité intestinale
Réduction du risque des diarrhées	-Résistance à la colonisation par des pathogènes
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	-Modulation de la flore intestinale
Réduction du cholestérole	-Assimilation du cholestérole -Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du colon	-Production de composés antimutagéniques -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques -Dégradation de carcinogènes -Élimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

## V. Matériel et méthodes

### V.1. Cadre d'étude

Le présent travail est effectué au sein du laboratoire de Contrôle de qualité, Faculté SNV/SNTU, Université 8 Mai 1945 Guelma, dans le but :

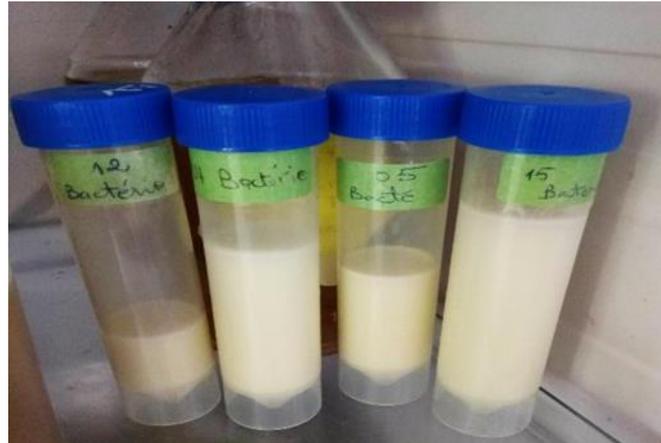
- D'isoler et identifier les bactéries lactiques à partir d'échantillons de lait maternel ;
- Evaluer le spectre d'action inhibitrice des isolats de BL sur des souches de collection américaine : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028.

### V.2. Collecte du lait

25 échantillons de lait maternel ont été obtenu à partir de différents centres médicaux de la wilaya de Guelma, aléatoirement sans aucunes conditions relatives à l'état de santé de la maman ou de son enfant.

Le lait maternel a été échantillonné dans de strictes conditions d'asepsie pour éviter tout risques de contamination extérieure pouvant modifier la composition de la flore originale. La procédure consiste à faire :

- Un lavage de mains des mamans au savon doux en présence du personnel ;
- Nettoyage des mamelons de seins avec un savon liquide neutre suivi d'un rinçage à l'eau ;
- Séchage avant chaque recueil
- Éliminer le premier jet afin d'éviter toute contamination cutanée, puis le recueil du lait a été fait directement dans des tubes stériles de 50 mL, munis d'étiquette sur laquelle est noté le numéro d'échantillon, date et lieu de prélèvement (fig.11). Ces échantillons ont été transporté au laboratoire dans une glacière et dans un délai de moins de 6 h.



**Figure 11** : Photo d'échantillons de lait maternel

### Recherche de la flore lactique

#### V.3. Numération

##### - Préparation de la série de dilution

Une gamme de dilutions décimales 0.1 ( $10^{-1}$ ), 0.01 ( $10^{-2}$ ), 0.001 ( $10^{-3}$ ) a été établie dans des conditions aseptiques. Le mode de préparation est minutieux et consiste à prendre des tubes stériles dans lesquels on pipette aseptiquement 9 mL de diluant (tryptone sel). Après avoir homogénéiser soigneusement le lait maternel, on prélève 1 mL et on l'introduit au premier tube de la série soit ( $10^{-1}$ ). Avec une nouvelle pipette et après agitation manuelle, on prélève 1 mL et on l'ensemence avec lequel le contenu du tube ( $10^{-2}$ ) et procéder de la même manière avec la dilution qui reste (Guiraud, 2003) (fig. 12 a et b). L'incubation se fait à 30°C. Le dénombrement des bactéries lactiques a été sur milieu MRS et M17 pour la flore totale par la méthode des dilutions décimales qui vont de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-3}$ .

##### - Inoculation sur la surface

Dans cette technique, 12 mL de milieux sélectifs MRS et M17 sont coulés dans les boites, laissés solidifiés. Ensuite, après solidification de la gélose, 1 mL de chaque dilution est placé sur la surface de gélose est ensemencé à l'aide d'une anse de platine. Par la suite l'ensemble des boites est incubé à 30°C durant 3 à 5 jrs (Boumediene, 2020).

#### Lecture et expression des résultats

Après incubation, les colonies bactériennes ayant poussées sont dénombrées par un compteur colonie et le nombre des bactéries et compté suivant la formule d'AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Dont :

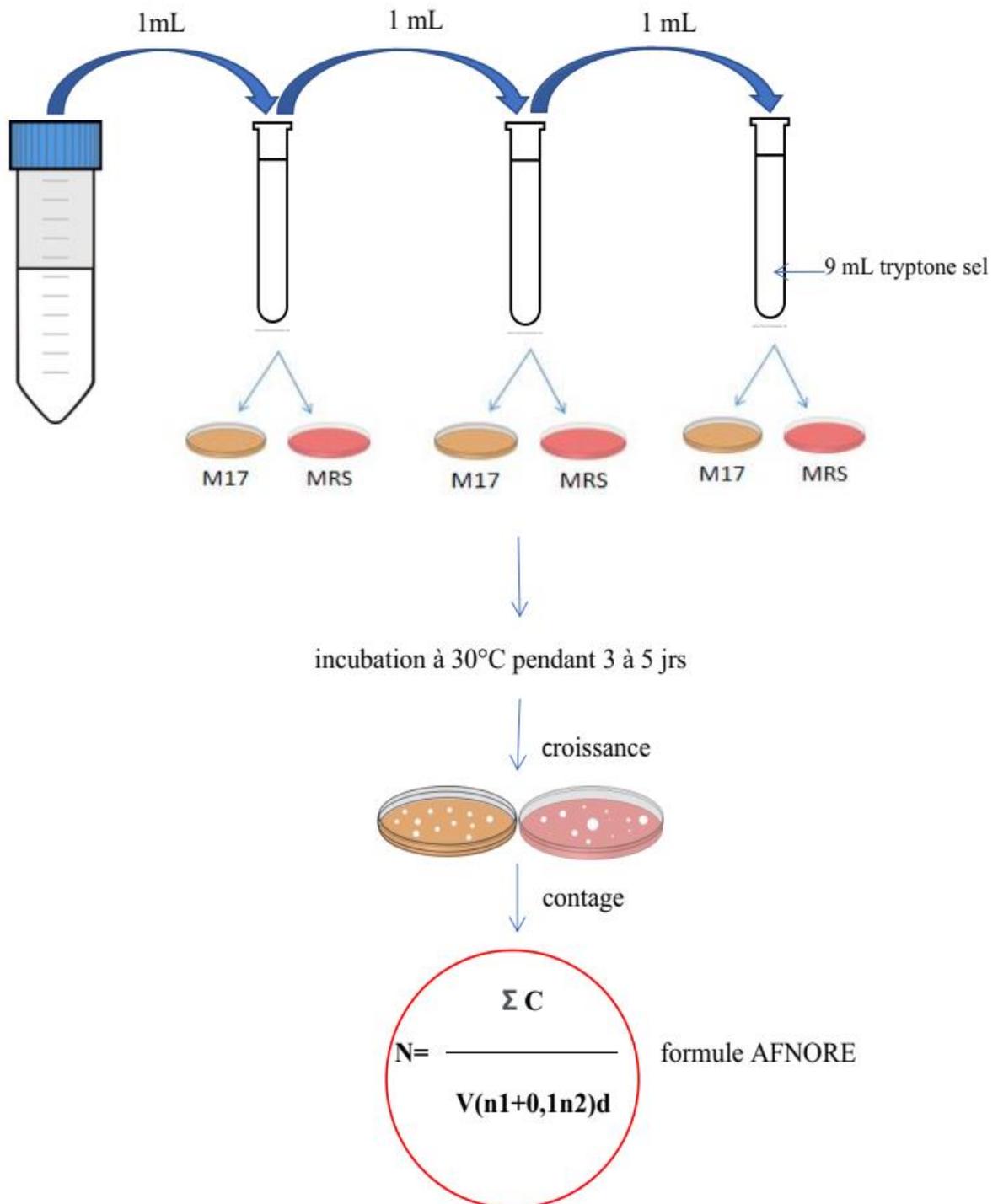
- $\sum C$  : somme totale des colonies comptées.
- $V$  : volume de l'inoculum.
- $n_1$  : nombre de boîtes comptées dans la première dilution.
- $n_2$  : nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.
- $d$  : le facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Si une seule boîte est comptable, la formule est la suivant :

$$N = \frac{c}{d}$$

- $c$  : nombre de colonies comptées.
- $d$  : le facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus





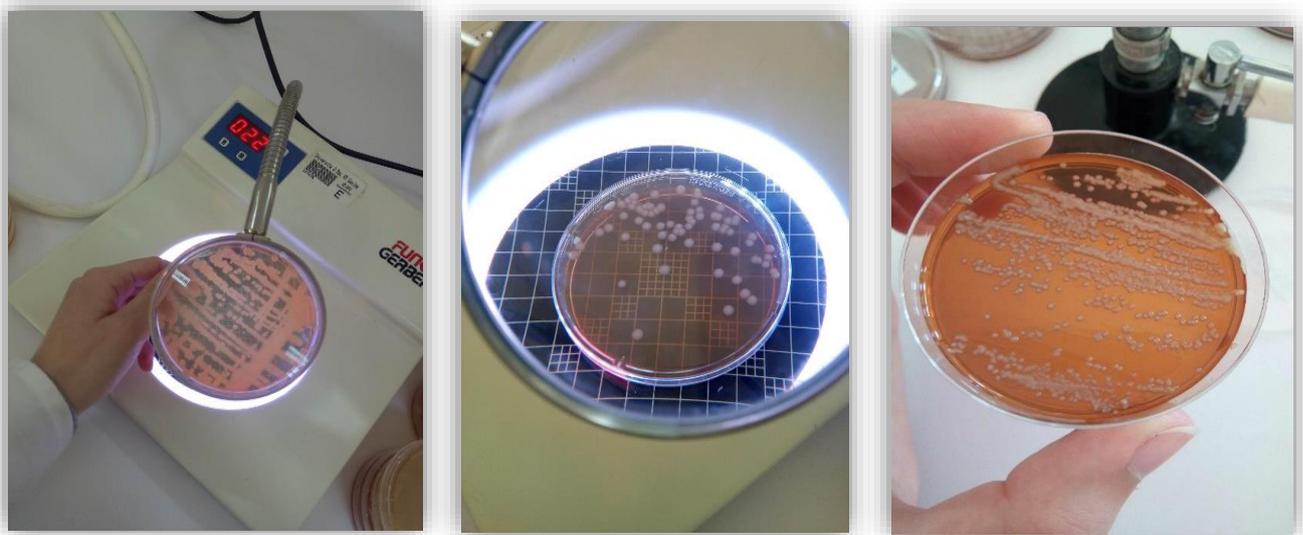
**Figure 12 :** Procédure de dénombrement des BL

#### V.4. Isolement et purification des BL

Avant isolement des BL, les échantillons du lait maternel ont subi une coagulation dans une étuve à 30°C pendant 24h afin d'enrichir et augmenter le nombre de la flore présente. Après incubation 0.1 mL du lait coagulé et homogénéisé a été transféré aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant les milieux sélectifs suivants :

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) : destiné à l'isolement des lactobacilles, *Pediococcus* et l'enrichissement du *Leuconostoc* ;
- Milieu M17 : permettant l'isolement des lactocoques : *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*

Les colonies obtenues ont été caractérisées sous loupe binoculaire, le Gram a été également confirmé. Seules les souches bactériennes présentant un Gram positif ont été repiquées sur les milieux MRS et M17 sur la surface, puis incubés à 30°C pendant 3 à 5jrs. L'aspect des cultures axéniques et contrôlé par l'homogénéité des caractères phénotypiques des souches issues de la même boîte (fig.13).



**Figure 13:** Aspect macroscopique des BL purifiées.

#### V.5. Conservation des BL

Les bactéries présentant les caractéristiques connues pour les BL ont été maintenues sur milieux solides MRS et M17 inclinés ; après 24 à 48h d'incubation à une température de croissance optimale, les cultures sont conservées au frais, puis repiquées sur bouillon nutritif pour des analyses ultérieures ([Guessas et Kihal, 2004](#)).

## V.6. Identification

La description phénotypique constitue la base de la détermination des BL. Diverses clés d'identifications ont été adoptées :

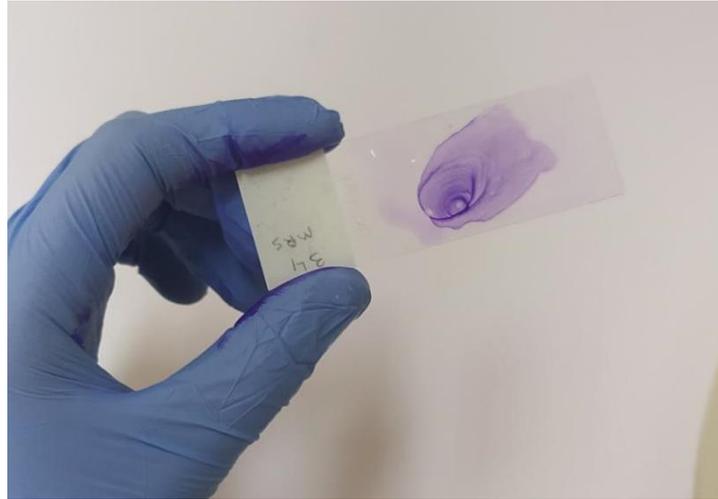
- La morphologie ;
- La physiologie incluant la croissance à des conditions variables de T°C, pH et salinité;
- Métabolisme : assimilation des sucres, acides aminés, production de gaz à partir de glucose (Mechai, 2009).

### V.6.1. Caractères cultureux et morphologiques

**a. Aspect macroscopique** : Cet examen permet de déterminer la taille, la couleur, et la forme des colonies développées sur les milieux de croissance. Permettant ainsi, une identification préliminaire des genres de bactéries lactiques (Djermene, 2020).

**b. Aspect microscopique** : effectué sur la base de la coloration tinctoriale de Gram (fig.14) et détaillé comme suite :

- Préparation d'un frottis et coloration au Cristal violet durant 1 min. ;
- Rinçage à l'eau ;
- Traiter le frottis pendant une minute par une solution de Lugol ;
- Faire une décoloration à l'éthanol en inclinant la lame jusqu'à ce que la dernière goutte apparaisse transparente ;
- Recolorer le frottis 30 s. avec de la Fuchsine, puis rincer abondamment à l'eau
- Rajouter l'huile de cèdre et visualiser le frottis sous l'objectif à immersion (x100) (Singleton, 1999).



**Figure 14** : Coloration différentielle de Gram des colonies issues de milieux MRS et M17

## V.6.2. Caractères physiologiques

### a. Croissance à différentes températures

Les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif et incubées à des températures variables : 10°C, 30°C et 45°C durant 24 à 48h.

### a. Croissance à différents pH

Le pH de bouillons nutritifs a été ajusté par des solutions d'HCl et NaOH pour l'obtention des pH de l'ordre de 4.4 et 9.6 permettant ainsi de différencier les BL durant 48h d'incubation à 30C° (fig.15) (Boumediene, 2013).



**Figure 15** : Mesure de pH tests pour la culture des BL.

### b. Croissance à différentes concentrations d'NaCl

65 g/L et 180 g/L d'NaCl ont été additionnés à des tubes contenant 5 mL de bouillon nutritif, après inoculation avec les souches cibles, les tubes sont incubés à 30 °C pendant 5 jours.

La modification des conditions de pH, température et salinité permet de voir la tolérance ou pas des bactéries lactiques. Toute croissance se traduit par un trouble du bouillon, si ce dernier garde le même aspect et couleur, cela indique que les bactéries sont mortes.

### V.6.3. Caractères biochimiques

#### a. Mise en évidence de la catalase

Les bactéries lactiques sont catalase négative. La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies facultatives, elle a le rôle essentiel d'éliminer, dès sa formation

le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), un composé très toxique immédiatement hydrolysé en eau et en oxygène selon l'équation :



Le test classique consiste à mettre du matériel bactérien prélevé par une anse de platine dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame en verre. Le dégagement de gaz indique la présence d'enzyme traduit par l'apparition des bulles d'air (dégagement gazeux d'O<sub>2</sub>) (fig.16) (Bousseboua, 2005).

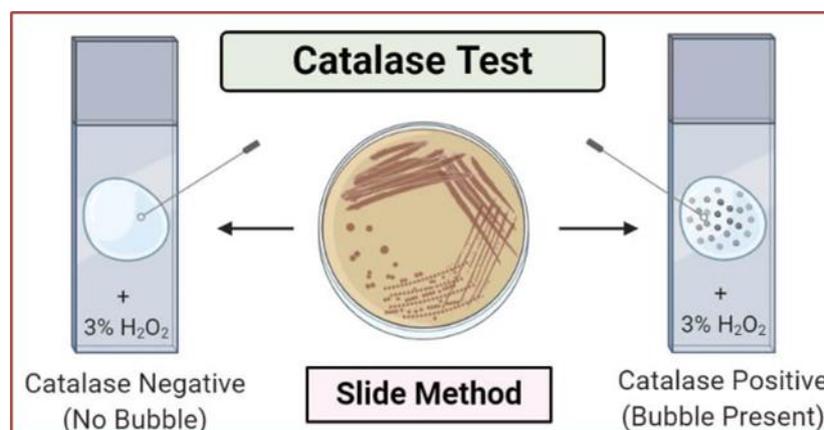


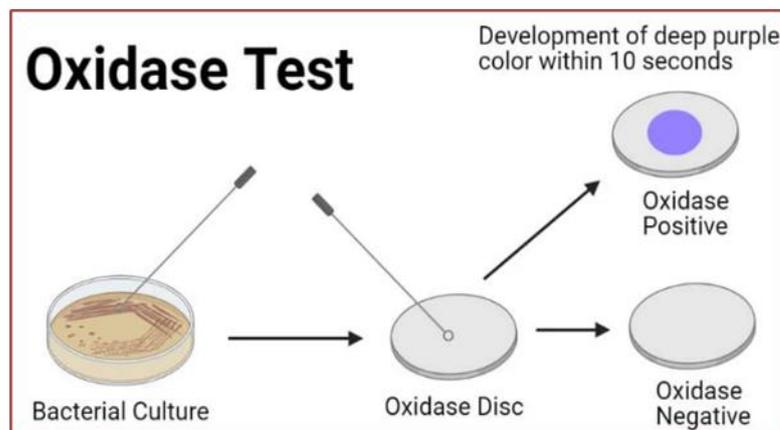
Figure 16 : Test catalase.

### b. Mise en évidence de la cytochrome oxydase

Ce test complémentaire renseigne sur le métabolisme respiratoire d'une bactérie permettant de détecter en particulier la chaîne de cytochrome C et l'oxydase associée.

- À l'aide de pinces, placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Prélever la colonie choisie à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse de platine (fig.17).
- Ne pas utiliser d'öse de métal (à l'exception du platine) cela peut provoquer des réactions faussement positives.

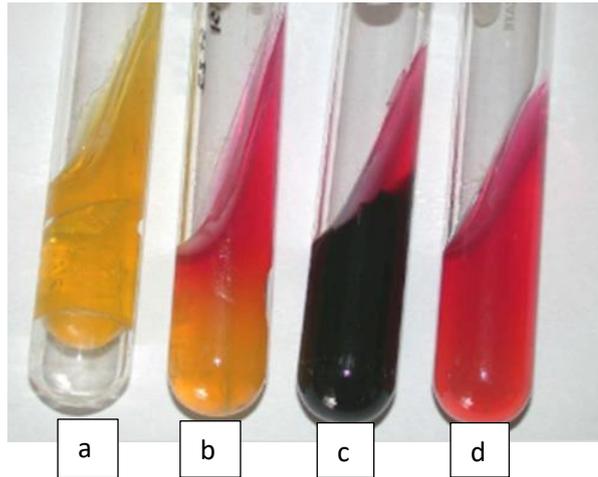
Les espèces oxydase-positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les la secondes (Savadogo, 2004).



**Figure 17 :** Test du cytochrome oxydase

### a. Métabolisme des sucres

L'utilisation des sucres : lactose, glucose et saccharose avec ou sans production de gaz ainsi que la production d'hydrogène sulfureux ( $H_2S$ ) a été déterminée sur milieu TSI (triple sugar iron). Les souches tests sont ensemencées dans le milieu par piqûre centrale dans le culot et par une strie médiane sur la pente, ensuite les tubes sont incubés à  $30^\circ C$  pendant 24h. Un changement de couleur vers le jaune au niveau de la pente et le culot traduit la fermentation des 3 sucres, le noircissement indique la production d' $H_2S$ . Des fissures dans la gélose ainsi qu'un décollement du culot indiquent la production du gaz  $CO_2$  (fig.18) (Boudersa, 2017).

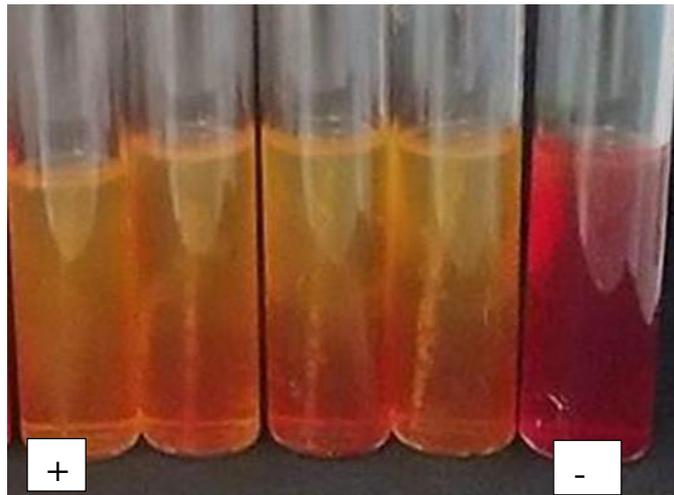


**Figure 18 :** Interprétation des résultats du TSI

(a) : Lac<sup>+</sup>, Sac<sup>+</sup>, Glu<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> et Gaz<sup>+</sup> ; (b) : Lac<sup>+</sup>, Sac<sup>-</sup>, Glu<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> et Gaz<sup>-</sup> ; (c) Lac<sup>+</sup>, Sac<sup>-</sup>, Glu<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> et Gaz<sup>-</sup> ; (d) : Lac<sup>+</sup>, Sac<sup>+</sup>, Glu<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> et Gaz<sup>-</sup>

#### **d. Mannitol mobilité**

L'ensemencement des colonies se fait par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, le résultat de ce test permet de déterminer la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. Après incubation de 48h à 30°C, si le milieu vire au jaune il indique une fermentation du mannitol accompagné d'une diffusion de la culture au tour de la piqure (bactérie mannitol +, mobile), dans le cas contraire aucun changement de couleur et une absence de voile autour de la piqure (bactérie mannitol -, immobile) (fig.19) (guillaum, 2004).



**Figure 19** : Test du Mannitol-mobilité

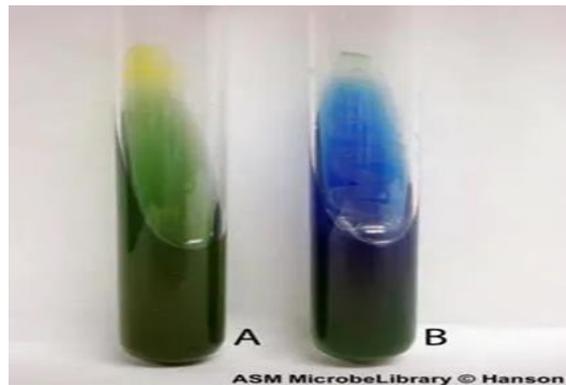
Aspect de milieu :

- Tube rouge : aspect initial de tube
- Tube orange et bulles : dégradation de mannitol et production du gaz
- Tube jaune et pas de bulles : dégradation de mannitol et pas de production de gaz

### c. Citrate de Simmons

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate ; seules les bactéries possédant un citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu estensemencée par une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie test. Après incubation à 30 °C pendant 3 jours. Les résultats sont interprétés comme suite (fig.20) :

- Citrate-positives : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate négatives : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (**Bekaddouri et al., 2020**).



**Figure 20** : Test du Citrate de Simmons

**A**: test négatif ; **B**:test positif

#### **a. Autres sucres**

La fermentation du D (-) arabinose et du D (+) galactose a été déterminée par la galerie Api 20 E. L'utilisation des sucres se traduit par un virage de l'indicateur colorée.

La technique consiste à ensemencer les microtubes de la galerie par une suspension de BL jeune et standardisée au préalable, puis recouvertes avec de l'huile de vaseline stérile afin d'obtenir les conditions d'anaérobiose. Par la suite, les plaques API sont incubées à 30°C durant 24 à 48h ([Khodja, 2018](#)).

#### **V.7. Dépistage du pouvoir antagoniste des isolats lactiques contre les bactéries pathogènes**

La recherche d'une éventuelle activité inhibitrice de bactéries lactiques est faite par deux méthodes à savoir : technique de spot et technique de puits. Ces techniques permettent de mettre en contact la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec les souches de collection américaine : *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant

**Tableau 5** : Caractéristiques des souches de références

La souche	Gram	Type respiratoire	Pouvoir pathogène
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Anaérobies facultatifs	Lesérotype Typhimuriume
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Aéro anaérobies	Certaines cutanées et infection ORL
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Anaérobies facultatifs	Infection urinaire Prostatites

### V.7.1. Méthode de puits

La sensibilité ou la résistance des souches pathogènes à l'action des BL a été évaluée selon De Almeida et al., (2015). La méthode consiste à :

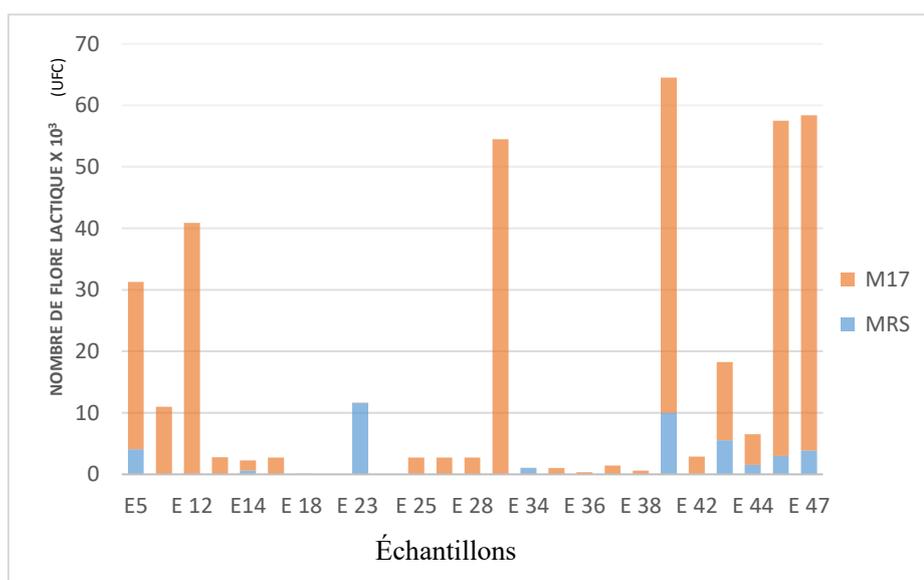
- Centrifuger à 8000 tr/min durant 10 min. une culture jeune de BL, le surnageant récupéré est conservé à 4°C.
- Créer avec un emporte - pièce des puits de 8mm dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive ;
- Inoculer par écouvillonnage les boîtes avec une culture jeune de bactéries de référence ;
- Déposer aseptiquement 100µl du surnageant de la culture lactique au niveau des puits, puis incuber à 30°C pendant 24 h.

L'inhibition des souches pathogène se manifeste par la présence d'une zone claire autour de la turbidité formée par les BL, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm. Selon Schillinger et Lucke, l'inhibition est considérée comme positive lorsque la zone est supérieure à 1 mm de diamètre.

## VI. Résultats et discussion

### VI.1. Résultat du dénombrement de la flore lactique

Le résultat du dénombrement de la flore lactique présente dans les échantillons du lait maternel est montré par la figure ci-dessous. On constate que le nombre de ces micro-organismes varie considérablement d'un milieu de culture à un autre et on note une omniprésence de cette flore dans le milieu M17 (fig.21).



**Figure 21** : Répartition de la flore lactique dans les milieux MRS et M17.

### VI.2. Criblage primaire de la fore lactique

#### VI.2.1. Aspect macroscopique et microscopique

La culture de BL sur les milieux sélectifs MRS et M17, nous a permis l'isolement de 43 souches bactériennes. 28 isolats sont obtenus sur M17 et 15 isolats sur milieu MRS. Ces bactéries présentent des Gram variables, sous formes de coques et bacilles, avec de modes de regroupement caractéristiques et propre à la souche. Des colonies de taille variable, de forme circulaire, d'aspect bombée ou plat avec un pourtour régulier ou irrégulier et de couleur diversifiée : blanche, jaune, rose, transparente ou du blanc grisâtre (fig.22).

Sur le milieu MRS, généralement l'ensemble de souches isolées se présente sous formes de sphères, ovoïdes. A l'exception des souches MRS2, MRS7 et MRS10 qui se présente sous forme de coques isolés ou regroupés en diplo ou en courte chaînette (fig.22) et (tab.6).

Pour le milieu M17, différentes formes ont pu être mis en évidence des coques regroupés en diplo, tétrade et en chaînette.

Par ailleurs, le Gram de la majorité des souches isolées est de type Gram-positif, en formes de coques ou bacilles, l'arrangement cellulaire est variable : paires, chaînettes, tétrades et en amas. Ces critères répondent aux caractéristiques morphologiques connues pour les bactéries lactiques. Les BL sont des Firmicutes, à Gram positif, non sporulantes. Elles peuvent avoir une forme de coques ou de bâtonnets (bacilles). Les BL sont généralement immobiles, catalase négatives et anaérobies facultatives, qui produisent l'acide lactique comme un produit principal final après fermentation de glucose (Bourgoi, 1996 ; Guiraud, 1998 ; Corrieu et Luquet, 2008).

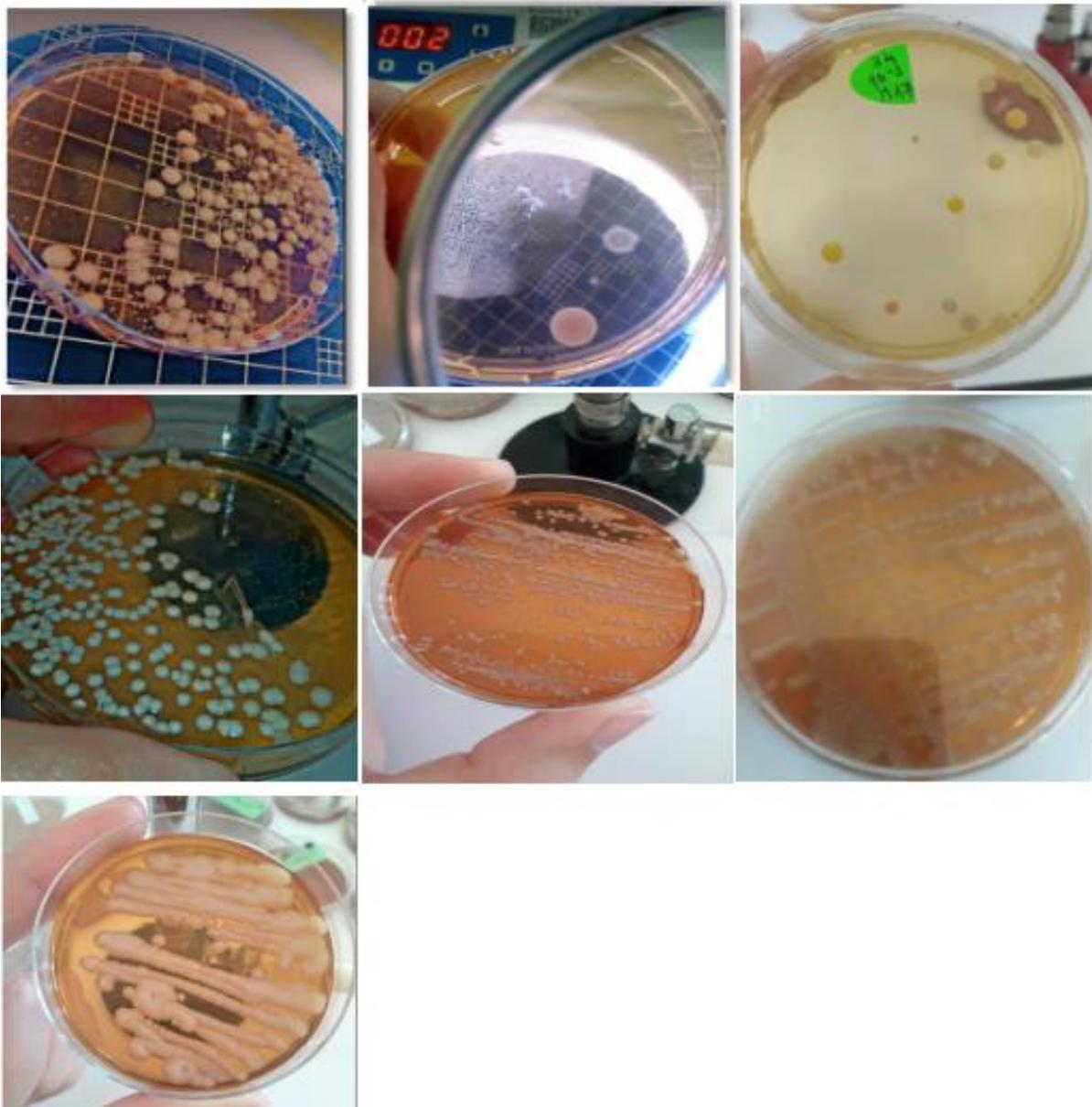
**Tableau 6** : Criblage primaire des souches isolées sur milieu MRS (a) et M17 (b).

(a)	Caractères microscopiques				Caractères macroscopiques		
	Gram	Forme	Arrangement	Mobilité	Couleur	Aspect	Contour
<b>MRS 1</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 2</b>	+	Coque	En chaîne	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 3</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 4</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 5</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 6</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 7</b>	+	Coque	Chaîne	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 8</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
<b>MRS 9</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 10</b>	+	Coque	Chaîne	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier

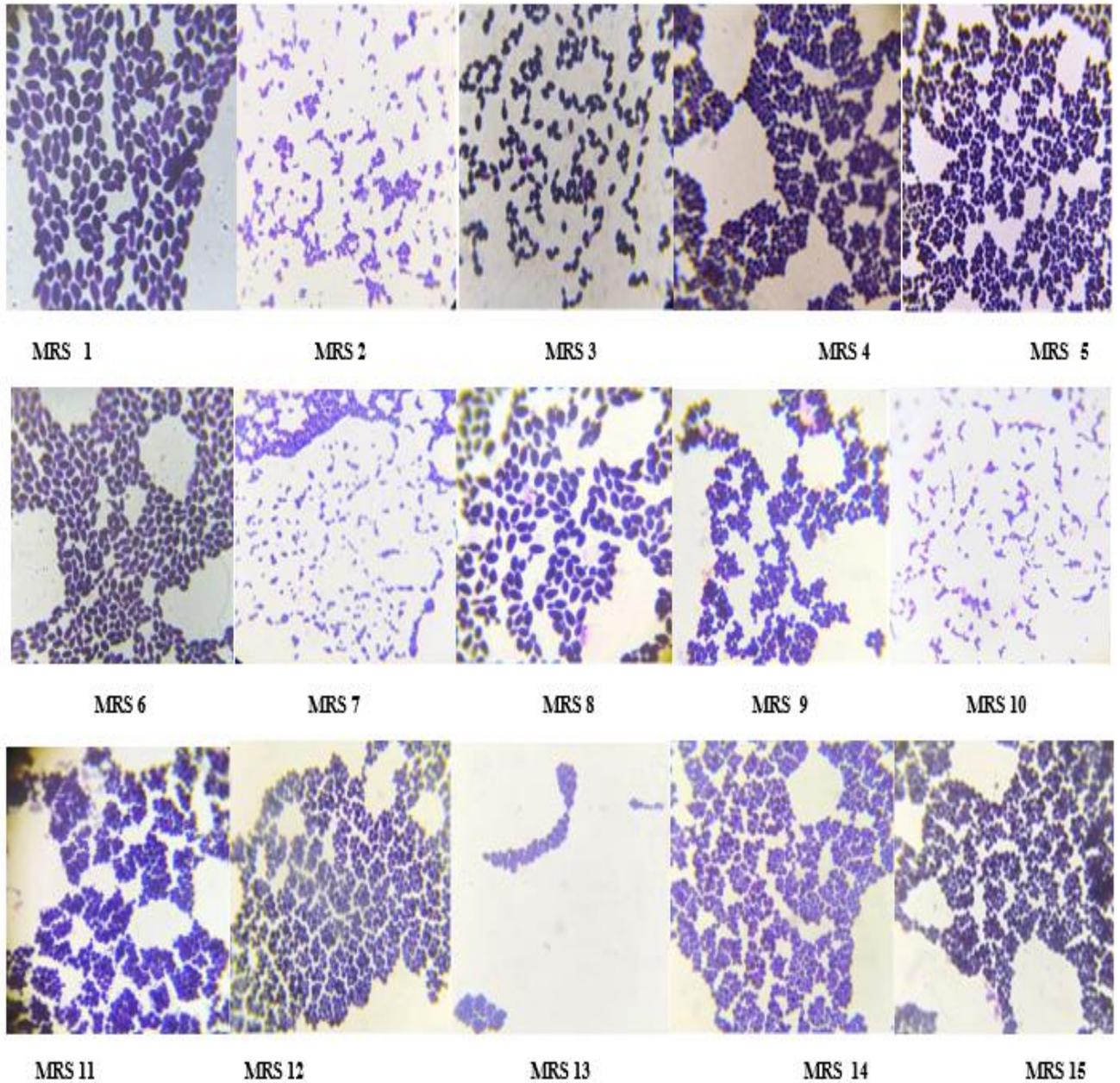
<b>MRS 11</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 12</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 13</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 14</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
<b>MRS 15</b>	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier

<b>(b)</b>	<b>Caractères microscopiques</b>				<b>Caractères macroscopiques</b>		
	Gram	Forme	Arrangement	Mobilité	Couleur	Aspect	Contour
M1	+	Coque	Tétrade	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M2	+	Coque	Chaîne	-	Transparente	Lisse	Régulier
M3	+	Coque	Amas	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M4	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
M5	+	Coque	Chaîne	-	Transparente	Lisse	Régulier
M8	+	Coque	Diplo/tétra	-	Transparente	Lisse	Régulier
M8A	+	Bacille	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M9	+	Bacille	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M9A	+	Bacille	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M15	+	Bacille	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M16	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier
M17	+	Bacille	Isolé	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M18	+	Coque	Amas	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M19	+	Coque	Amas	-	Transparente	Lisse	Régulier
M23	+	Coque	Amas	-	Blanchâtre	Lisse	Régulier
M25	+	Ovoïde	Isolé	-	Transparente	Lisse	Régulier

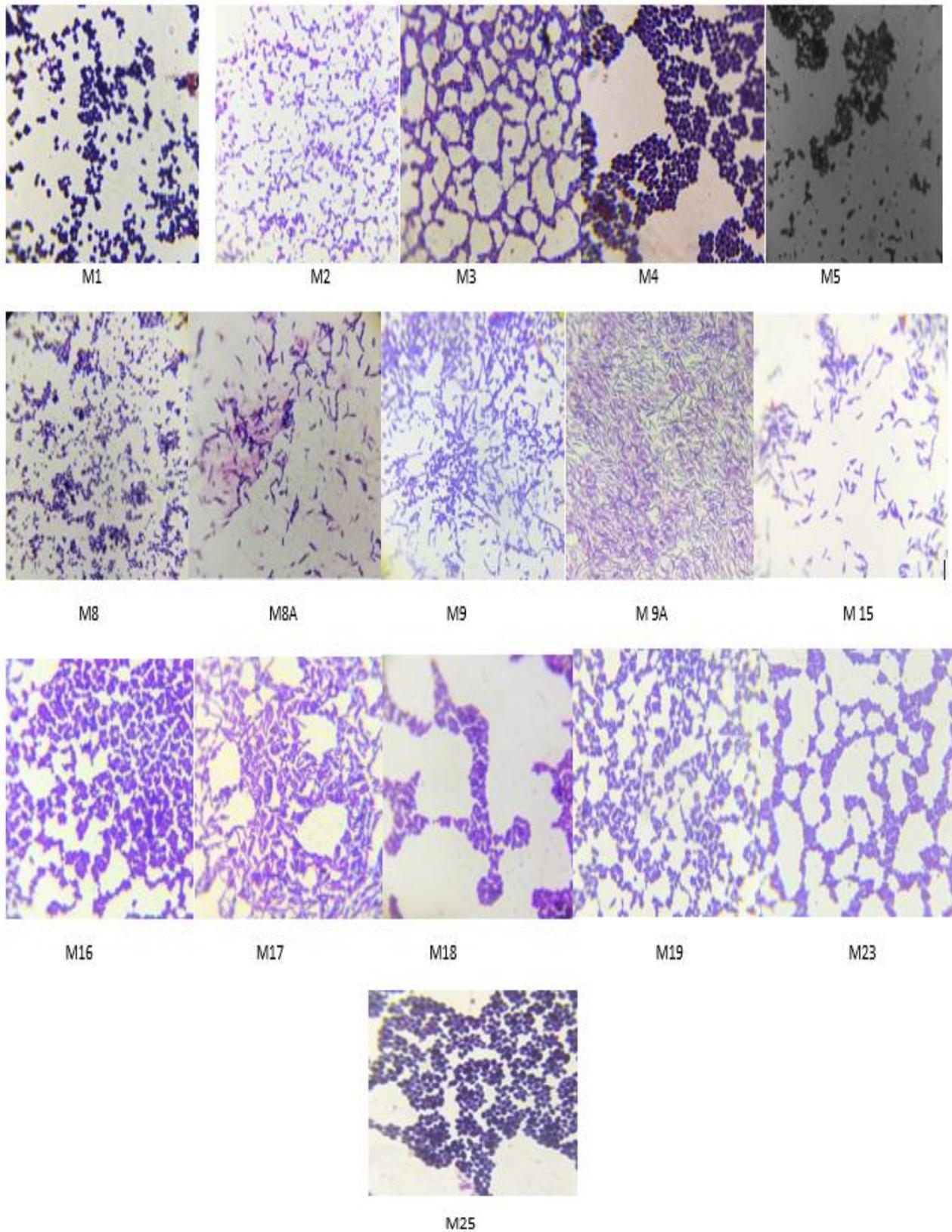
Selon Mechai (2009), les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weisella*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*. À l'exception de quelques espèces, les BL sont des micr-organismes non pathogènes (Papadimitriou *et al.*, 2016).



**Figure 22** : Aspect macroscopiques des isolats bactériens sur milieux MRS et M17.

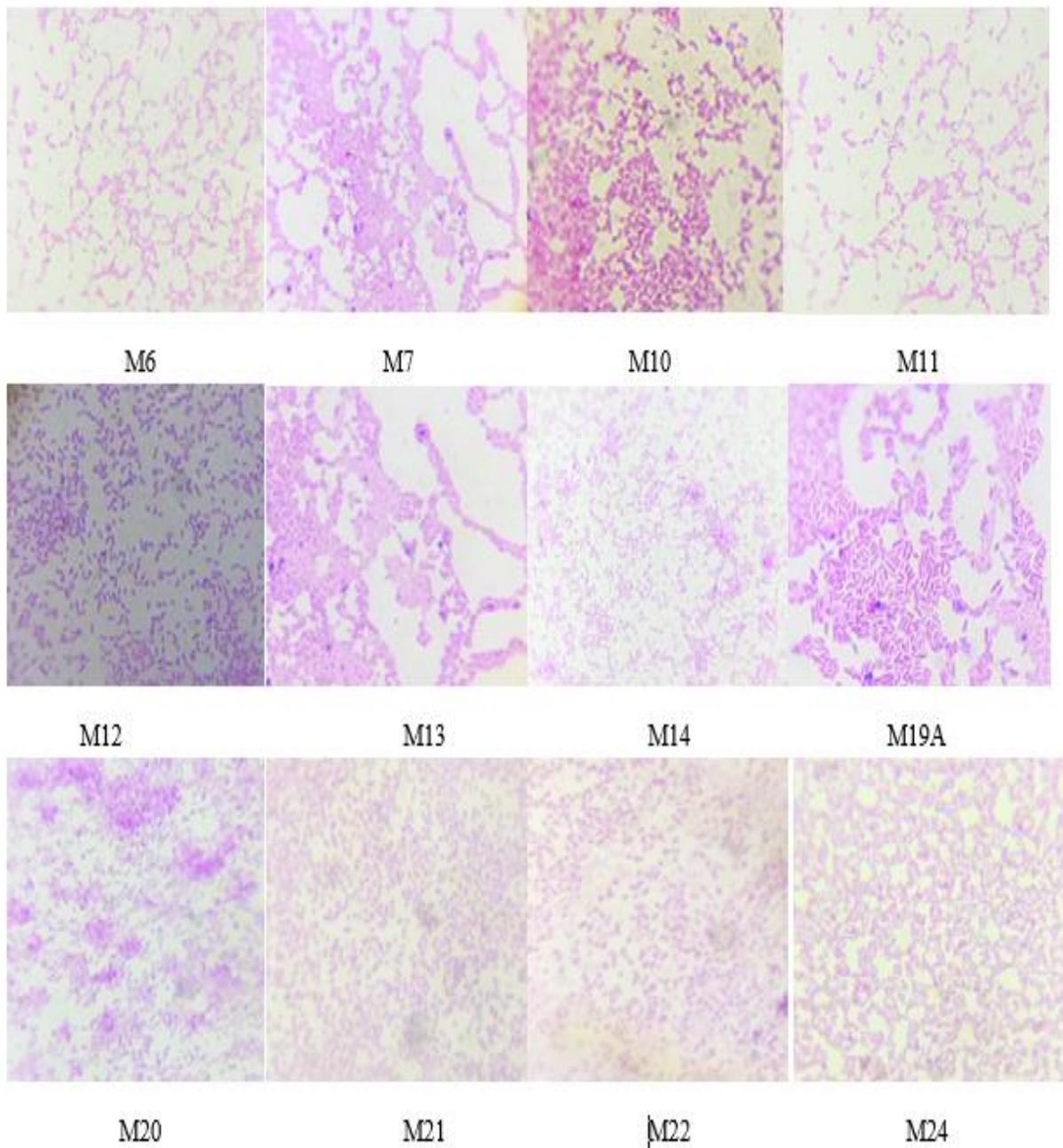


**Figure 23** : Aspect microscopique des isolats bactériens sur MRS (microscope photonique, Gr : x100).



**Figure 24 :** Aspect microscopique des isolats bactériens sur milieu M17 (microscope photonique, Gr : x100).

Outre que les Gram<sup>+</sup>, des bactéries Gram<sup>-</sup> de forme bacillaire, on put être isolées sur milieu M17(fig.25). Ces bactéries ne répondent pas aux caractéristiques des BL. Les caractéristiques phénotypiques sont illustrées dans le tableau (7).



**Figure 25** : Autres bactéries isolées à partir du lait maternel sur milieu M17 (microscope photonique, Gram- : x100).

**Tableau 7** : Caractéristiques des bactéries Gram- isolées sur M17 (c).

(c)	Caractères microscopiques				Caractères macroscopiques		
	Gram	Forme	MR	Mobilité	Couleur	Aspect	Contour
M6	-	B	Isolé	+	Transparente	Lisse	Rég
M7	-	B	Isolé	+	Jaune	Lisse	Irrég
M10	-	B	Isolé	+	Jaune	Lisse	Irrég
M11	-	B	Isolé	-	Blanchatre	Lisse	Rég
M12	-	B	Isolé	+	Blanchatre	Lisse	Rég
M13	-	B	Isolé	+	Jaune	Lisse	Irrég
M14	-	B	Isolé	+	Blanchatre	Lisse	Rég
M19A	-	B	Isolé	-	Jaune	Lisse	Irrég
M20	-	B	Isolé	+	Blanchatre	Lisse	Rég
M21	-	B	Isolé	+	Blanchatre	Lisse	Rég
M22	-	B	Isolé	+	Blanchatre	Lisse	Rég
M24	-	B	Isolé	+	Transparente	Lisse	Rég

+ : Présence du caractère ; - : Absence du caractère.

### VI.3. Résultats de l'identification de la flore lactique

#### VI.3.1. Caractères physiologiques

Les résultats de la caractérisation physiologique des isolats Gram + à partir des milieux sélectifs MRS et M17 sont présentés dans les tableaux 8 et 9 ci-dessous.

Le suivi de la croissance des BL sur milieu MRS montre que la majorité d'entre elles poussent à 46°C avec des optimums de 25 et 40°C. En revanche, les souches MRS 2,3,6,7,10 et 11 montrent une tolérance de croissance claire à 60°C, ces bactéries sont considérées comme thermorésistantes.

Pour le pH, on note une croissance favorable en milieu acidifié. Concernant la salinité, aucune souche ne tolère les fortes concentrations en sel (18%), à l'exception des souches MRS 3,6,12 et 14.

Sur milieu M17, l'ensemble des souches isolées poussent à pH 4.4, sauf excepté des souches M4, M8A, M15, M17, M18, M23 et M25. Pour la salinité, la majorité des souches tolèrent la présence du NaCl et montrent un trouble de croissance sur bouillon nutritif.

En ce qui concerne la température, presque la moitié des espèces isolées poussent à 10°C. Les souches 19 et 20 préfèrent des températures de 46°C (tab.9 et fig.26).

Généralement les BL poussent à pH optimum de 6,2, le pH 4.4 ne montre pas d'effet inhibiteur de croissance sur les souches. Certaines, telles que l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* peut vivre à un pH de 2 (Benmechernene et al.,2013). En effet, les bactéries lactiques isolées sont considérées comme acidotolérantes. Cette caractéristique est due probablement à l'activité protectrice des exopolysaccharides produits par ces flores (Denkova et al., 2017).

La croissance des BL à des températures différentes est considéré comme critère clé de distinction entre les souches isolées.

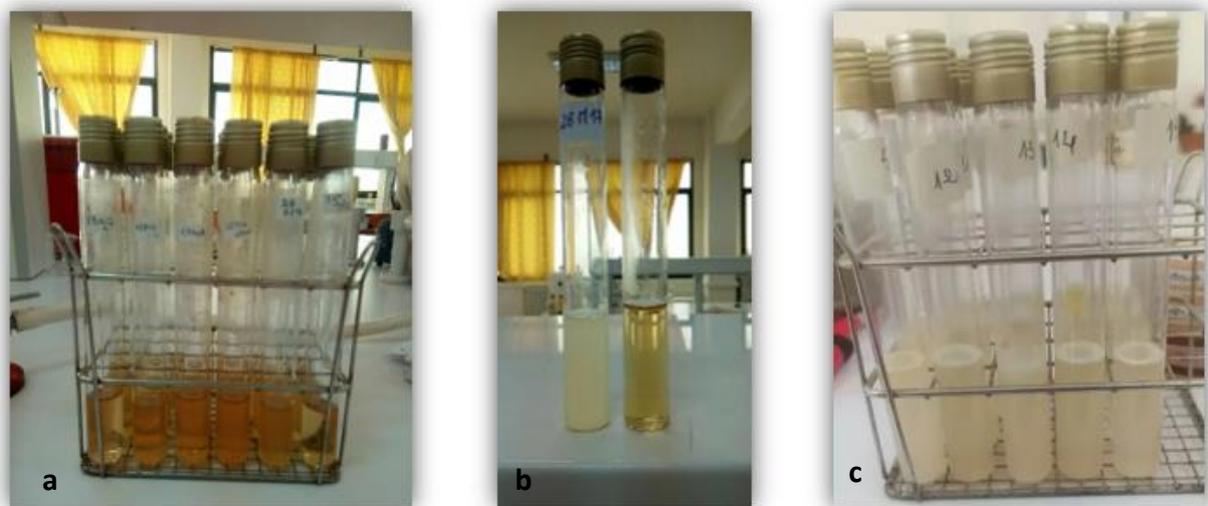
**Tableau 8** : Caractères physiologiques de BL sur milieu MRS

Echantillons	Croissance à différents pH		Croissance à différentes concentrations de NaCl		Croissance à différentes températures (°C)		
	pH=9.6	pH=4.4	18% NaCl	6.5% NaCl	10°C	46°C	60°C
MRS 1	+	-	-	-	+	+	-
MRS2	-	+	-	-	-	+	+
MRS3	-	+	+	+	-	-	+
MRS4	+	+	-	+	-	+	-
MRS5	+	-	-	+	-	+	-
MRS6	-	+	+	+	+	-	+
MRS7	-	+	-	-	-	+	+
MRS8	+	-	-	+	-	+	-
MRS9	+	+	-	-	+	-	-
MRS10	-	+	-	-	-	+	+
MRS11	+	+	-	-	-	+	+
MRS12	+	+	+	+	-	+	-
MRS13	+	+	-	+	+	+	-
MRS14	+	+	+	+	-	+	-
MRS15	+	+	-	+	-	+	-

+ : Présence du caractère ; - : Absence du caractère.

**Tableau 9** : Caractères physiologiques de BL sur milieu M17.

Souches	Croissance à différents pH		Croissance à différentes concentrations d'NaCl		Croissance à différentes températures (°C)		
	pH=9.6	pH=4.4	18% NaCl	6.5% NaCl	10°	46°	60°
M1	-	+	-	+	+	-	+
M2	-	-	-	-	+	-	-
M3	-	+	+	+	+	+	-
M4	+	-	-	+	+	+	+
M5	-	+	-	+	+	-	-
M8	-	+	-	-	+	+	-
M8A	+	+	+	-	+	-	+
M9	-	+	+	+	+	-	-
M9A	-	+	+	+	+	+/-	-
M15	+	+	-	-	+	-	-
M16	-	+	-	+	+	-	-
M17	+	+	-	+	+	-	-
M18	+	+	-	+	-	-	+
M19	-	+	-	+	-	+	-
M23	+	+	-	+	-	+	-
M25	+	+	-	+	+	+	+

**Figure 26** : Caractérisation physiologique des BL (a) : températures variables ; (b) : différents pH ; (c) : concentrations variables de NaCl.

## VI.3.2. Caractères métaboliques

### VI.3.2.1. Tests complémentaires

Les tests catalase et oxydase effectués sur souches purifiées sur MRS et M17 montrent l'absence de ces enzymes chez toutes les bactéries Gram+, confirmant ainsi les caractères propres aux BL.

### VI.3.3. Caractères biochimiques

L'identification métaboliques établie sur la base des propriétés : oxydase, catalase et dégradation des sucres est présenté dans les tableaux 10 et 11 et 12

On distingue de nos résultats que les 30 souches Gram positif cultivées sur milieux MRS et M17 sont dépourvues de catalase et oxydase (fig.27).



**Figure 27** : Résultats des tests complémentaires (a) : Catalase- ; (b) : Oxydase

Les profils biochimiques des espèces isolées sont détaillés dans les tableaux 10, 11 et 12 et les figures 27, et 28

**Tableau 10** : Profil biochimique des espèces isolées sur MRS.

Milieu	Forme	Gram	Cat	Mob	Oxy	Man	Cit	H <sub>2</sub> S	Gaz	Glu	Sac	Lac	Ara
MRS													
MRS 1	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
MRS 2	Coque	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	NE
MRS 3	Ovoïde	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
MRS 4	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
MRS 5	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
MRS 6	Ovoïde	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
MRS7	Coque	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	NE
MRS 8	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
MRS 9	Ovoïde	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	NE
MRS10	Coque	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	NE
MRS11	Ovoïde	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	NE
MRS 12	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
MRS 13	Ovoïde	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	NE
MRS 14	Ovoïde	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	NE
MRS 15	Ovoïde	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-

**Tableau 11** : Profil biochimique des espèces isolées sur M17.

Milieu M17	Forme	Gram	cat	Mob	Oxy	Man	Cit	H <sub>2</sub> S	Gaz	Glu	Sac	Lac	Ara
M1	<b>Tétrade</b>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M2	<b>Coque</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
M3	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	<b>NE</b>
M4	<b>Ovoïde</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<b>NE</b>
M5	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
M8	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
M8A	<b>Bacille</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	<b>NE</b>
M9	<b>Bacille</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	<b>NE</b>
M15	<b>Bacille</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	<b>NE</b>
M16	<b>Coque</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
M17	<b>Bacille</b>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
M18	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	<b>NE</b>
M19	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
M23	<b>Coque</b>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<b>NE</b>
M25	<b>Ovoïde</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	<b>NE</b>

**Tableau 12** : Profil biochimique des bactéries Gram- isolées sur M17.

Milieu M17	Forme	Gram	cat	Mob	Oxy	Man	Cit	H <sub>2</sub> S	Gaz	Glu	Sac	Lac
M6	<b>Bacille</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
M7	<b>Bacille</b>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
M10	<b>Bacille</b>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
M11	<b>Bacille</b>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M12	<b>Bacille</b>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
M13	<b>Bacille</b>	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
M14	<b>Bacille</b>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
M19A	<b>Bacille</b>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M20	<b>Bacille</b>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M21	<b>Bacille</b>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M22	<b>Bacille</b>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M24	<b>Bacille</b>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+



**Figure 28** : Identification des caractères métaboliques par galerie classique et système API

D'après la littérature, le lait maternel est composé d'une grande variété de composés biologiquement actifs. Ce milieu considéré avant l'année 2000 comme milieu stérile exempt de micro-organisme joue un rôle crucial dans la colonisation des muqueuses, développement du système immunitaire du nourrisson et dans le maintien de sa croissance (Boukhalfi, 2020). Les études menées sur la culture de la flore lactique du lait maternel montrent la dominance des espèces *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus fermentum* dans tous les prélèvements (Martin, et al., 2003). Sur la base des résultats issus du criblage phénotypique : morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, à différents pH, salinité la fermentation des différents hydrates de carbone tests de croissance (Holzapfel et al., 2001) et en comparaison avec les propriétés déterminés et présumés pour les bactéries lactiques (tab.14) et (tab.15), on a pu identifier les souches isolées au stade du genre.

Sur la totalité des souches isolées, 31 isolats caractérisés appartiennent aux genres : *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus* et *Pediococcus* et *Bifidobacterium*.

#### Sur milieu MRS :

- Les souches MRS1 et 8 représentent les caractéristiques du *Leuconostoc mesenteroides* ;
- Les souches MRS2, 7 et 10 se rapprochent de l'espèce *Streptococcus thermophilus* ;
- Les souches MRS 4, 5, 12 et 15 montrent les propriétés d'*Enterococcus sp.* ;
- Les isolats MRS 9,11, 14, et 13 sont des lactocoques et particulièrement au genre *Lactococcus* qui sont des cocci ou ovoïdes, homofermentaires, ne résistent pas à des concentrations de 6.5% d'NaCl Et enfin, les souches 6 et 3 se rapproche de l'espèce *Tetragenococcus spl.*

#### Sur milieu M17 :

La souche 1 représente les caractéristiques de *Pediococcus sp.* Les espèces de ce genre sont mésophiles leur métabolisme est de type homofermentaire, ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir du glucose, lac-, Poussant à un pH de 5. Leur température de croissance varie de 25°C à 35°C. (Holzapfel et al 2009 ; Lahtinem et al, 2012), et peut tolérer jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005) ;

- Les souches M 2, 16, 19, 5 et 8 représentent de l'espèce *Lactococcus sp.*;
-

- Les souches 4 et 25 sont des Enterocoques ;
- Les deux souches 8A et 15 reflètent les propriétés du *Bifidobacterium sp.*;
- Les isolats M9, 9A appartiennent au genre *Lactobacillus sp1, sp2 et sp.3* respectivement .
- Et enfin, les souches M3, 18 et 23 représentent le genre *Tetragenococcus sp.*

Bouguerra (2021) rapporte que la présence du genre *Leuconostoc* est toujours combinée par la présence du *Lactococcus spp* du fait que ce dernier produit de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub> ainsi que de l'éthanol ou de l'acétate favorables à la poussée du *Ln*.

**Tableau 13 :** Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques

Caractéristiques	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weisella</i>
Morphologie	bacilles	bacilles	coques	coques	coques	Coques ovales	coques	coques	coques	Coques/bacilles
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Gaz à partir de glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Isomère d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL
Hydrolyse d'arginine	+	±	ND	±	-	-	±	±	ND	-
mDAP	+	±	ND	-	-	-	-	-	ND	-

+ positive ; - négative ; ± résultats variés selon l'espèces ; ND, non déterminé.

**Tableau 14** : Critères d'identification du *Bifidobacterium* et le *Streptococcus thermophilus* (Tabak , Bensoltane, 2011).

Souche lactique		<i>Sc. thermophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Bf. bifidum</i>
Tests étudiés				
Etude morphologique	Aspect macroscopique	Colonies rondes ou lenticulaires de couleur blanche crème	Petites colonies identiques de couleur blanche crème	des colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier
	Aspect microscopique	Des coques Gram positif (+) groupés en paires ou en chaînes.	Des bacilles Gram positif (+) groupés en paires ou en chaînes.	Gram positif, sous forme de bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.
	Test de catalase	Catalase négatif (-)	Catalase négatif (-)	Catalase négatif (-)
Etude biochimique	Test d'oxydase	Oxydase négatif (-)	Oxydase négatif (-)	Oxydase négatif (-)
	Test du milieu TSI	Lactose (+), saccharose (+), glucose (+)	Glucose (+), lactose (+), saccharose (-)	Glucose (+), lactose (+), saccharose (-)
	Fermentation du lactose	Lactose positif (+)	Lactose positif (+)	Lactose positif (+)
	Test du Mannitol	Mannitol négatif (-)	Mannitol négatif (-)	Mannitol négatif (-)
Etude	Test de la mobilité	Cellules immobiles	Cellules immobiles	Cellules immobiles

+ : Réaction positive.

- : Réaction négative

#### VI.4. Activité antibactérienne des isolats lactiques

Les souches bactériennes isolées du lait maternel ont été testées pour leur pouvoir antibactérien contre les souches *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212. Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'un halo clair autour des puits des souches : *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus* et *Enterococcus*. Les zones d'inhibition exprimées en cm sont présentées dans le tableau 15 et illustrés par la figure 29.

Les résultats montrent que les souches lactiques testées exercent un pouvoir puissant contre *S. aureus* ATCC 29213 illustré par des zones > 2 mm. Dortu et Thonart, (2009) rapportent que les BL produisent généralement des métabolites secondaires (bactériocines) qui ont un effet dirigée contre les bactéries à Gram positif aucune contre les bactéries à Gram négatif.

Par ailleurs, les espèces *Tetragenococcus sp.2* et *Enterococcus sp* présente une action positive sur les souches *S. typhimurium* ATCC 14028 et *E. faecalis* ATCC 29212.

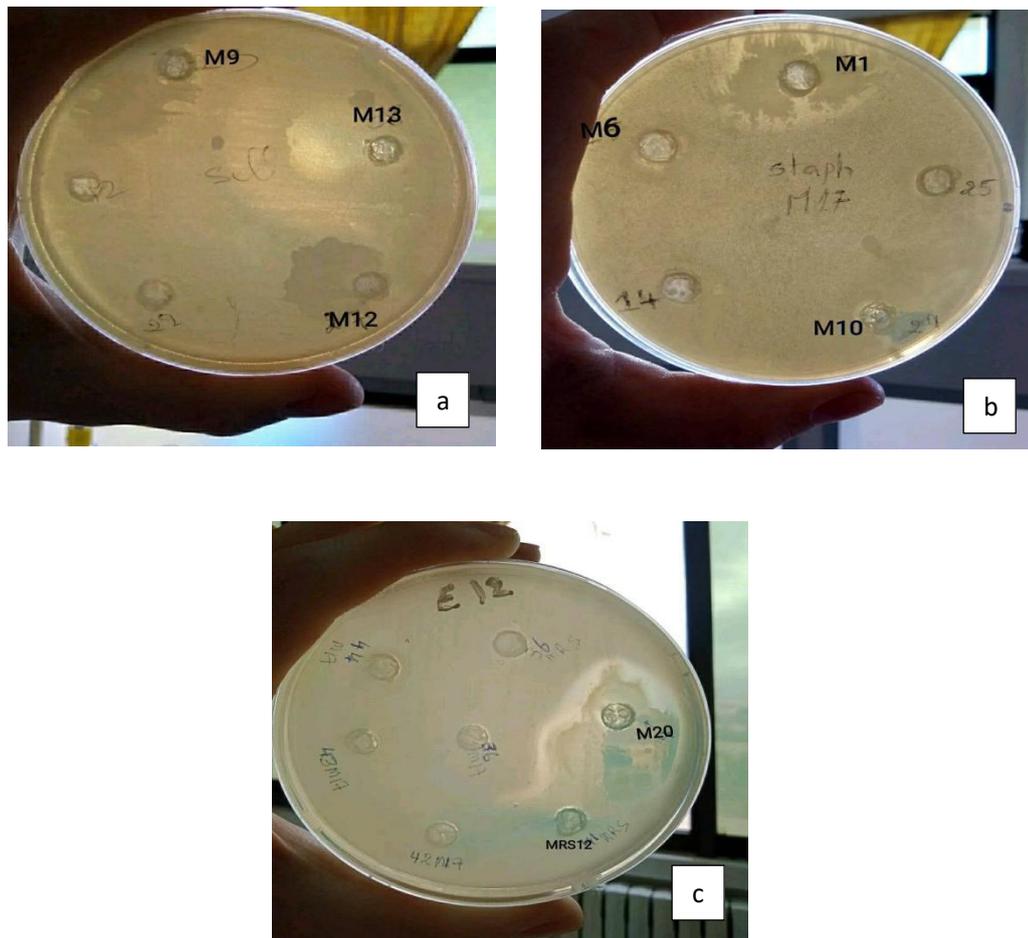
Tableau 15 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches lactiques testées.

Isolats du MRS	<i>S. typhirium</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
	ATTC 14028	ATCC29213	ATCC29212
	Horizontal/vertical	Horizontal/vertical	Horizontal/vertical
<i>S. thermophilus</i>	00/00	1,5Cm/0,7Cm	00/00
<i>Lactococcus sp.1</i>	1Cm/1,3Cm	00/00	00/00
<i>Lactococcus sp.2</i>	00/00	1,5Cm/1Cm	0,6Cm/1,2Cm

Isolas du M17	<i>S. typhirium</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
	ATTC 14028	ATCC29213	ATCC29212
	Horizontal/vertical	Horizontal/vertical	Horizontal/vertical
<i>Lactococcus sp.1.</i>	00/00	1,1Cm/1Cm	00/00
<i>Bifidobactérium sp.</i>	00/00	2Cm/1,8Cm	00/00
<i>Lactococcus sp.2.</i>	00/00	1,3Cm/1Cm	00/00
<i>Tetragenococcus sp1.</i>	00/00	3,2Cm/3,1Cm	7Cm/6Cm
<i>Lactococcus sp.3.</i>	00/00	2Cm/2,3Cm	00/00
<i>Lactobacillus sp1.</i>	00/00	1,2Cm/1Cm	00/00
<i>Tetragenococcus sp2.</i>	1,2Cm/1,3Cm	00/00	1,4Cm/1,7Cm
<i>Entérocooccus sp.</i>	2Cm/2,1Cm	00/00	1,5Cm/1,5Cm

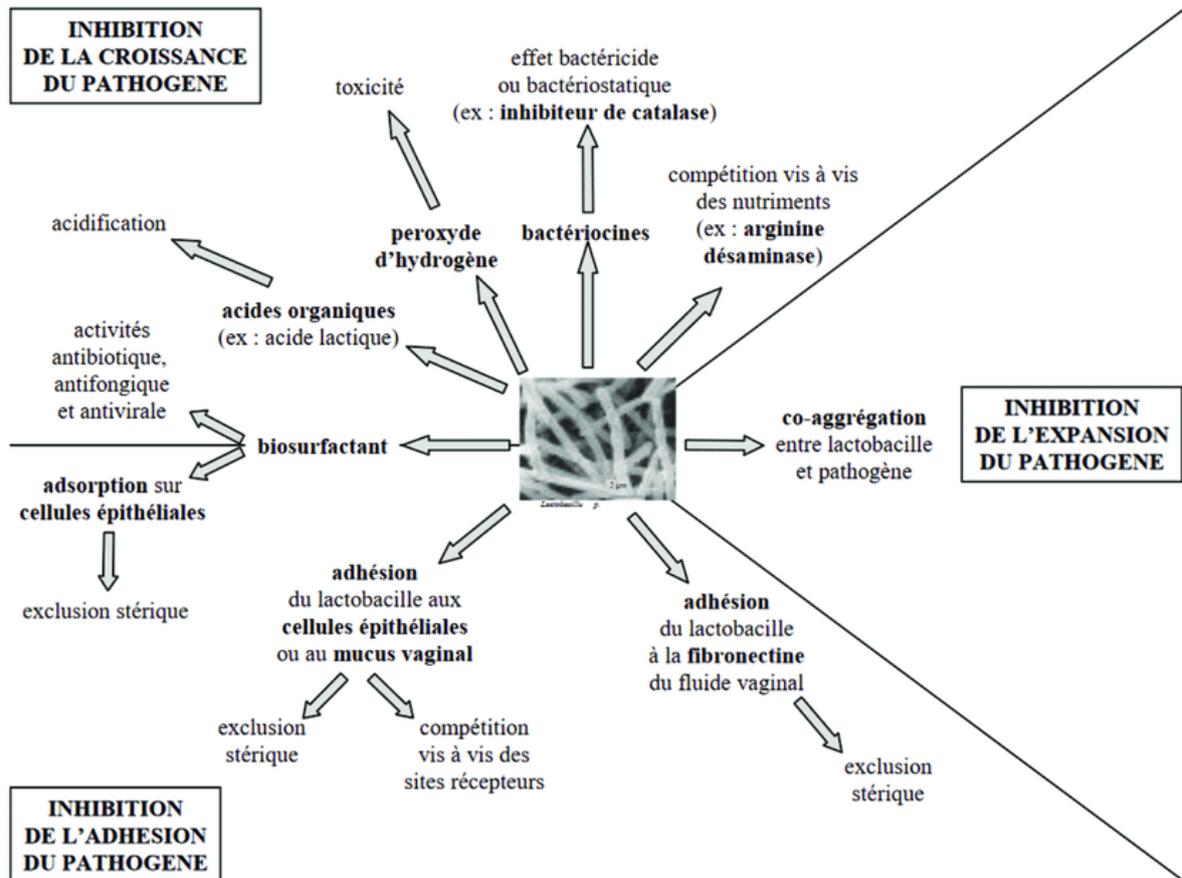
L'effet antibactérien puissant de BL contre les bactéries testées est probablement dû à plusieurs facteurs, tels que le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, (Schillinger *et al.*, 1996), la production d'acide lactique et acétique, ces métabolites une fois libérés dans la culture conduit à une baisse de pH empêchant ainsi la prolifération des bactéries indésirables (Kihal *et al.*, 2006).

Nos résultats se corroborent avec ceux de **Mami (2013)** et **Saidi et Guennoun (2021)** qui rapportent que les genres *Lactococcus* et *Enterococcus* secrètent des bactériocines thermorésistantes. Ces dernières molécules sont des métabolites secondaires de nature protéique à effet antimicrobien. Leur mode d'action consiste à une formation de pores au niveau de la membrane de la cellule cible.



**Figure 29** : Effet antibactériens des BL sur les souches cibles : (a) *S. typhimurium* ATCC14028(M 9, M 13 ,M 12 ). (b) : *S. aureus* ATCC 29213( M 1 , M 6 , M 10) ; (c) *E. faecalis* ATCC 29212 (MRS 12 , M 20).

La figure ci-dessous résume l'effet antibactérien des BL contre les agents pathogènes.



**Figure 30** : Schéma récapitulatif du mode d'action des BL sur des souches pathogènes (Lepargneur et Rousseau, 2012).

## VII. Conclusion

Le lait maternel est l'aliment de choix pour les nourrissons et reste le seul qui répond à leurs besoins sur le plan nutritionnel et physiologique. De nombreux travaux scientifiques montrent que les effets bénéfiques de cet aliment ne peuvent être guère apportés par des laits artificiels. Ce support nutritionnel n'apporte uniquement pas de macro et micronutriments, de vitamines et de composés bioactifs mais également une large gamme de flore microbienne à effets diversifiés. Dans ce contexte s'inscrit les objectifs du présent travail qui consiste à :

- Isoler la flore lactique ;
- Caractériser les BL sur le plan morphologique, physiologique et métabolique ;
- Rechercher d'éventuelles activités antibactériennes visant à exploiter de nouvelles molécules de lutte contre la multi-résistance des germes pathogènes.

Les résultats issus de l'analyse bactériologique montrent :

- 43 souches ont pu être isolées sur les milieux sélectifs employés, dont 15 souches ont été déterminées sur MRS et 23 souches sur milieu M17 ;
- Les bactéries isolées présentent des Gram variables, sous formes de coques et bacilles, avec des modes de regroupement caractéristiques et propres à la souche. Des colonies de taille variable, de forme circulaire, d'aspect bombé ou plat avec un pourtour régulier ou irrégulier et de couleur diversifiée : blanche, jaune, rose, transparente ou du blanc grisâtre
- Outre que les Gram<sup>+</sup>, des bactéries Gram<sup>-</sup> de forme bacillaire, ont été observées sur milieu M17, l'identification de ces micro-organismes n'a pas été détaillée car ils ne répondent pas aux caractéristiques de BL.
- Sur le plan physiologique, les BL présentent des adaptations variables aux conditions hostiles ;
- La caractérisation métabolique des BL montre leur appartenance aux genres : *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne par technique de puits, montre que les souches *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus* et *Enterococcus* exercent un effet puissant sur *S. aureus* ATCC 29213.

Par ailleurs, les genres *Tetragenococcus* et *Enterococcus* montre une activité inhibitrice des souches *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Salmonella. typhimurium* ATCC 14028. Effets probablement dus à de nombreux facteurs tels que l'acidité du milieu et la production de nouveaux métabolites dirigées contre des souches pathogènes, ce qui pourrait aboutir à leur exploitation comme agents naturels de lutte.

En perspectives d'étude, il serait judicieux de :

- Faire une identification plus approfondie des caractères métaboliques ;
- Identifier les souches collectées par méthodes moléculaires ;
- Identifier et extraire les métabolites à effets antimicrobiens ;
- Tester l'effet inhibiteur de BL sur des agents d'altération alimentaires tels que les champignons ;
- Recherché d'autres caractères probiotiques chez les souches.

## Résumé

Le présent travail consiste à étudier les caractéristiques morphologiques, physiologiques et métaboliques de la flore lactique du lait maternel, et évaluer par conséquent leur pouvoir inhibiteur de souches de collection. La numération de ces micro-organismes sur les milieux sélectifs MRS et M17 montre leur forte présence dans le milieu M17. Le criblage primaire a permis de répertorier 43 souches dont 28 souches sont isolées sur M17 et 15 sur milieu MRS. L'identification basée sur les critères de classification connus pour les BL montre l'appartenance des isolats aux genres : *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. L'effet antagonique évalué par méthode de puits et la méthode de spot montre que les espèces *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212 sont fortement inhibées par les BL, dues probablement à la production de métabolites antimicrobiens. L'étude de telles interactions inhibitrices des BL à l'égard de bactéries pathogènes envisagera leur exploitation à des fins technologiques.

**Mots clés :** Lait maternel ; Bactéries lactiques ; Pouvoir inhibiteur ; Métabolites antimicrobiens

## **Abstract**

The aim of the present work is to study the morphological, physiological and metabolic characteristics of the lactic flora of breast milk, and consequently to evaluate their inhibitory power against collection strains. Counts of these microorganisms on selective MRS and M17 media show their strong presence in the M17 medium. Primary screening identified 43 strains, 28 of which were isolated on M17 and 15 on MRS medium. Identification based on known LAB classification criteria showed that the isolates belonged to the following genera: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. The antagonistic effect assessed by well and spot methods shows that *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 29213 and *E. faecalis* ATCC 29212 are strongly inhibited by LAB, probably due to the production of antimicrobial metabolites. The study of such inhibitory interactions of LAB towards pathogenic bacteria will consider their exploitation for technological purposes.

**Key words** : Breast milk ; Lactic acid bacteria ; Inhibitory power ; Antimicrobial metabolites

## المخلص

العمل المقدم ينص على دراسة الخصائص المورفولوجية الفيزيولوجية و الأيضية للبكتيريا الموجودة في حليب الأم و تقييم قدرتها على تثبيط السلالات المرجعية. تعداد هذه الكائنات الدقيقة في الأوساط الانتقائية MRS و M17 يوضح وجودها بقوة في الوسط M17 . مكن الفحص الأولي من تحديد 43 سلالة ، 28 منها معزولة من M17 و 15 من وسط MRS . معايير تصنيف بكتيريا الحليب تظهر إنتماء إلى جنس *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. , المضاد الذي تم دراسته بواسطة طريقة puit و spote أظهر أن الأنواع أن الأنواع *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 29213 و *E. faecalis* ATCC 29212 مشبطة بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك وهذا راجع إلى إنتاج مواد مضادة لهاته البكتيريا. دراسة مثل هذه التفاعلات لبكتيريا حمض اللاكتيك المشبطة لباقي البكتيريا المسببة للأمراض ، أدى إلى إستغلالها لأغراض تكنولوجية.

## الكلمات المفتاحية

حليب الثدي , بكتيريا حمض اللاكتيك, قوة التثبيط, الايض المضاد للبكتيريا

## **Annexes**

### **Annexe 1 : milieux de culture**

#### **Composition du milieu M.R.S (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Acétate de sodium : 5g inhibiteur
- Phosphate bipotassique 2g
- Citrate d'ammonium 2g
- sulfate de magnésium 0.25g
- Sulfate de manganèse 0.05g
- Glucose 20g
- Tween 80 1ml : agent sélectif
- Eau distillée 1000 ml
- pH 5.

#### **Composition du milieu M17 (Terzaghi et Sandine,1975)**

- Extrait de levure 2.5g
- Extrait de viande 5g
- Tryptone 2.5g
- Peptone papainique de soja 2.5g
- Peptone pepsique de viande 5g
- Peptone de caseine 10g
- Acide ascorbique 0.5g
- Lactose 5g
- Glycérophosphate de sodium 19g

-MgSO<sub>4</sub> 0.25g

-Agar-agar 15g

-Eau distillée 1000 ml

### **Composition du milieu TSI**

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure 3,0 g

- Extrait de viande 3,0 g

- Peptone 20,0 g

- Chlorure de sodium 5,0 g

- Lactose 10,0 g

- Saccharose 10,0 g

- Glucose 1,0 g

- Thiosulfate de sodium 0,3 g

- Citrate de fer (III) 0,3 g

- Rouge de phénol 24,0 mg

- Agar agar bactériologique 9,0 g

### **Composition de citrate de simmons (SIMMONS, J.S. 1926).**

La gélose Simmons citrate est préparée selon la formule décrite par Simmons (1)

-Citrate de sodium 1

-Chlorure de sodium 5

-Sulfate de magnésium 0,2

-Phosphate mono-ammonique 1

-Phosphate dipotassique 1

-Bleu de bromothymol 0,08

-Agar 15

-pH final  $6,8 \pm 0,2$

**Composition de milieu mannitol mobilité nitrate (version 2010).**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

-Peptone de caséine 10,00

-Mannitol 7,50

-Nitrate de potassium 1,00

-Rouge de phénol 0,04

-Agar 3,50

-pH final à 25°C : 7,6

**Composition de milieu GN -Tryptone 5,0g**

-Extrait de viande 1,0g

-Extrait de levure 2,0g

-chlorure de sodium 5,0g

-Agar agar bactériologique 12,0g

**Composition de milieu bouillon tryptone sel** -Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

-Tryptone (peptone de caséine) 1,00g

-Chlorure de sodium 8,50g

-pH final à 25°C :  $7.1 \pm 0.2$

**Composition de milieu gélose chapman**

-Peptone 10g

- Extrait de viande de boeuf 1,0g

- Chlorure de sodium 75g
- Mannitol 10g
- Rouge de phenol 0,025g
- Gélose 15g
- PH final 7.1 +/- 0.2

### **Composition de milieu macconkey**

- Peptone (Digestion pancréatique de gélatine) 17g
- Protéose peptone (viande et caséine) 3g
- Violet de cristal 1 mg
- Lactose monohydraté 10g
- Gélose 13.5 g
- Sels biliaires 1.5g
- Eau distillée 1 litre
- Chlorure de sodium 5 g
- pH Final 7.1 +/- 0.2

### **Annexe 2 : coloration de gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par Passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes

7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette

8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes

9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes

10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes

11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un Fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent Bleue violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent Distinctement rosâtres.

## Références bibliographique

**Ababsa, A. (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait.

**Alamer, M.A .;** Basiouni, G.F. Feeding effect of Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) on lactation performance, some plasma constituent and growth hormone level in goats. *Pak. J. Biol. Sci.* **2005**.

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

**Andres, J. et al., 2018.** Physiological Translocation of Lactic Acid Bacteria during Pregnancy Contributes to the Composition of the Milk Microbiota in Mice. *Nutrients*, Volume 10, p. 14.

**Axelsson, L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York.

**Bahmani, M.;** Shirzad, H.; Mirhosseini, M.; Mesripour, A.; Rafieian-Kopaei, M. A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L). *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2016**.

**Behammadi. T. (2009)** Les déterminants du choix du mode d'allaitement ; Étude prospective auprès de 111 femmes À la maternité de Max Fourestier de Nanterre.

**Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Cañamero, M., Guyot, J. P., Gálvez, A. (2006).** Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saagla, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *Int.J.FoodMicrobiol.*, 112: 44-50.

**BOUCHARD\_Damien** s. d

**Bougaddima. Y. et al.,(2019).** Isolement et identification des bactéries lactiques à statut probiotique à partir de *Sardina pilchardus*.

**Bouguera. A. (2021) :** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle.

**Boukhalfi, F. (2019)** Contribution à l'évaluation de quelques caractères probiotiques et technologique du Bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons et lait maternel.

**Boumediene, K. (2013)** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes.

**Česlovas, J., J. Vigilijus, and Š. Almantas. 2005.** The effect of probiotics and phytobiotics on meat properties and quality in pigs. *Vet. Zootech.* 29:80–84.

**Chi, M.M.; Schlein, A.L.; Moley, K.H.** High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* **2000**.

**Djamel .R.2021** .Comparaison entre potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées à partir de lait chèvre et lait de chamelle.

**Dolié, E., 2018.** Toulouse (UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES): s.n.

**Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ.*, 13: 143-154.

**El-Ziney, M.G, M Uyttendaele, J Debevere, et M Jakobsen.** «Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures.» *Biotechnol Lett* 20 (**1998**): 913916.

**FAO/WHO, 2002.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario: s.n.

**Fernández, L. et al., 2013.** The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease.. *Pharmacol. Res.*, Volume 69, p. 1–10.

**Fernandez, L. et al., 2013.** The microbiota of human milk. *Cell Mol. Biol*, 59( ), p. 31–42.

**Galvez, A, H Abriouel, R.L Lopez, et N Ben Omar.**«Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. » *Int J Food Microbiol* 120 (**2007**): 51–70

**Gan, B. S., J. Kim, G. Reid, P. Cadieux, and J. C. Howard. 2002.** *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J. Infect. Dis.* 185(9):1369-1372.

**Gevers. D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

**Ghraiiri, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., Manai, M. (2008).** Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *FoodCont.*, 19: 162-169.

**Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 591-606.

**Guarner, F. A. G. K. J. G. R. E. A. G. A. T. J. K. T. L. e. J.-J. G., 2011.** Probiotiques et Prébiotiques, s.l.: s.n.

**Guessas, B., Fatma, A., Miloud, H. & Mebrouk, K. 2012.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*, 17, 480-488

**Guide (2009)** Le lait maternel est la meilleure alimentation pour votre bébé, c'est un "aliment complet" que vous fabriquez. [Source : "Guide de l'Allaitement maternel" - INPES 2009.](#)

**Guide. (2019)** L'allaitement maternel guide à l'usage des professionnels de la santé.

**Hammi .I. 2016.** isolement et caractérisation de bactériocine produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes varieties de fromages français.

**Heikkila MP, Saris PE.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* (2003) 95(3):471–8. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x

**Heng, N.C.K, P.A Wescombe, J.P Burton, R.W Jack, et J.R Tagg.** The Diversity of Bacteriocins in Gram positive Bacteria. Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: Springer Verlag, 2007.

**Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 365S–73S.

**IZQUIERDO\_ALEGRE\_Esther\_2009.** LES PROTEINES BACTERIENES EN TANT QUE BIOMARQUEURS DE L'ACTIVITE PROBIOTIQUE. s. d.

**Janlou. C. F. (2013)** Le lait maternel contiendrait plus de 700 espèces de bactéries. "JANLOU CHAPUT, FUTURA 2013".

**Juillard V ., Spinnler H.E ., Desmazeaud J ., Boquien C.V. (1987).**Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait*, 67(2) : 149-172.

**Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S. (2009).** Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strains. *Pak.J.Nutr.*, 8: 242-250.

**Klaenhammer, T.R.** "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Biochimie* 70 (1988): 337-349.

**Kostinek, M., Specht, I., Vinod, A., Edward., Ulrich Schillinger, U., Hertel, C., Wilhelm,H., Holzapfel., Charles, M. A. P., Franza. (2005).** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 527–540.

**Le Doare, Kirsty,** Beth Holder, Aisha Bassett, et Pia S. Pannaraj. « Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity ». *Frontiers in Immunology* 9 (28 février 2018): 361.

**Léonard L. (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France, p8-10, 13-15, 17-18.

**Lepargneur, J-P, and V Rousseau. 2012.** "Rôle Protecteur de La Flore de Doderlein. " *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction* 31 (5) : 485–94. <https://doi.org/JGYN-09-2002-31-5-0368-2315-101019-ART7>.

**Leveau J.Y, and M Bouix. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, edited by Tec & Doc (Lavoisier. Paris), pp. 85-87.

**Li, J., W. Wang, S. X. Xu, N. A. Magarvey, and J. K. McCormick. 2011** *b. Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in *staphylococci*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 108(8):3360-3365.

**Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, et al.** Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. Clin Exp Allergy (2010) 40(5):811–9. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03437.x

**Mahgoub, A.A.S.; Sallam, M.T.** Effect of Extract Crushed Fenugreek Seeds as Feed Additive on some Blood Parameters, Milk Yield and Its Composition of Lactating Egyptian Buffaloes. J. Anim. Poult. Sci. **2016**.

**Maldonado, A, B Caballero-Guerrero, E Jimenez, R Jiménez-Díaz, J. L Ruiz-Barba, and J. M Rodriguez.** «Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum». Int J Food Microbiol.133 (2009): 105-112.

**Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus* . World J. Dairy & Sci., 3: 39-49.

**Martin Agnoux, A.; Alexandre-Gouabau, M.C.; Le Drean, G.; Antignac, J.P.; Parnet, P.** Relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. Acta Physiol. **2014**.

**Martin, R. et al., 2009.** Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 75(4), pp. 965-9.

**Matib . L. et al.,(2020).** Propriétés probiotiques des bactéries lactiques du lait maternel et de la flore intestinale des nourrissons.

**Mechai A. et Kirane D., (2008).**Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raïb”. African Journal of Biotechnology, 7 (16):p 2908-2914.

**Morag, M.; Popliker, F.; Yagil, R.** Effect of litter size on milk yield in the rat. *Lab. Anim.* **1975.**

**Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D. & Kihal, M. 2006.** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy Food and Sciences*, 1, 12-18.

**Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D. & Kihal, M. 2006.** Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy Food and Sciences*, 1, 12-18.

**Murase, M (2017).**; Wagner, E.A.; Chantry, C.J.; Dewey, K.G.; Nommsen-Rivers, L.A. The Relation between Breast Milk Sodium to Potassium Ratio and Maternal Report of a Milk Supply Concern. *J. Pediatr.*

**Novick, R. P. 2003.** Mobile genetic elements and bacterial toxins: the super antigens coding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49(2):93-105.

**Novick, R. P., G. E. Christie, and J. R. Penades. 2010.** The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(8):541-551.

**Ouwehand AC, S. Salminen, E. Isolauri. 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82(1-4):279-89.

**Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., Angelis, M. De, Gobbetti, M., Kleerebezem, M., ... Kok, J. (2016).** Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837–890.

**Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Folligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015).** Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*.

**Picciano MF :** Nutrient Composition of Human Milk. *Pediatr Clin North Am* 2001.

**Pot, B., Feli, G. E. & D., B. K., 2014.** The genus *Lactobacillus*. . Dans: W. B. J. Holzapfel W H, éd. *In: Lactic Acid Bacteria; Biodiversity and Taxonomy*.. s.l.:John Wiley & Sons., pp. 249-353.

**Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. (2008).** Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology advances*, 26(1), 22–34.

**Reid, G. 1999.** The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):3763-3766.

**Rodel, H.G.; Prager, G.; Stefanski, V.; von Holst, D.; Hudson, R.** Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol. Behav.* **2008**.

**Rubio, R., A., J., Martín, B. A. T. & Garriga, M., 2014.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food microbiology*, Volume 38, pp. 303-311.

**Schillinger, U. & Lücke, F. K. 1989.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.

**Sevrin, T. ; Alexandre-Gouabau, M.-C.; Castellano, B.; Aguesse, A.; Ouguerram, K.; Ngyuen, P.; Darmaun, D.; Boquien, C.-Y.** Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients* **2019**.

**Sevrin, T.; Alexandre-Gouabau, M.C.; Darmaun, D.; Palvadeau, A.; Andre, A.; Nguyen, P.; Ouguerram, K.; Boquien, C.Y.** Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PLoS ONE* **2017**.

**Smith, J.L.; Lear, S.R.; Forte, T.M.; Ko, W.; Massimi, M.; Erickson, S.K.** Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J. Lipid Res.* **1998** .

**Steffensen, K.R.; Gustafsson, J.-Å.** Putative Metabolic Effects of the Liver X Receptor (LXR). *Diabetes* 2004, 53, S36-S42, doi:10.2337/diabetes.53.2007.S36.

**Strus, M, T Gosiewski, P Kochan, and P.B Heczko.** "The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities." *FEMS Immuno. Medical Microbiol* 48 (**2006**): 56- 63.

**TABAK Souhila, BENSOLTANE Ahmed (2011)** , L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales .

**Tackoen. M. (2012)** Le lait maternel : composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles.

**Thomas. S. (2020)** La production de lait maternel peut-elle être modulée par une supplémentation nutritionnelle en fenugrec ou en arginine.

**Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B. (2014).** Phylogenetics and systematics. In: Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (Eds). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom.

**Vollenweider, S.** "3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production." *Appl Microbiol Biotech* 64 (2004): 16-27.

**Von Dreele, M.M.** Age-related changes in body fluid volumes in young spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol* (1988).

**Yarwood, J. M., and P. M. Schlievert. 2003.** Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* 112(11):1620-1625.

**Zalan, Z, A Barath, and A Halasz.** "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains." *Food Technol Biotech* 43 (2005): 219-225.

## **Sites web**

1. <https://www.infirmiers.com>
2. <https://www.futura-sciences.com>
3. <https://microbiologie-clinique.com/Chapman.html>
4. <https://microbiologie-clinique.com/TSI.html>
5. [https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/TC\\_257-Mannitol-Mobilite\\_FR\\_230215.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_257-Mannitol-Mobilite_FR_230215.pdf)
6. <https://microbiologie-clinique.com/G%C3%A9lose-nutritive.html>
7. [https://www.grosseron.com/tryptone-sel-bouillon\\_51-385-1-851-1-2448.html](https://www.grosseron.com/tryptone-sel-bouillon_51-385-1-851-1-2448.html)
8. <https://microbiologie-clinique.com/MacCONKEY.html>