

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE 8 MAI 1945 DE GUELMA
FACULTE DES SCIENCES ET DE L'INGENIERIE
DEPRATEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option: Biologie Moléculaire des procaryotes

Thème : Contribution à l'étude des caractéristiques des bactéries lactiques et essai de transformation par un ADN plasmidique

Présenté par :

MOUMENE Mérièm

TABET Mouna

Membres du jury :

- Présidente : AYAD H. (M.A.T. Université de Guelma)
- Examinatrice : BOUABID R. (M. A.T. Université de Guelma)
- Encadreur : BEN OUARETH D.E. (Prof. Université de Guelma)
- Membre invité : KSOURI S. (M.A.T. Université d'Om El Bouaghi)

Juin 2010

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert
d'amour et d'affection*

A mon adorable jumelle :

Hanna, pour ses encouragements et son soutien

A mes sœurs :

*Mouna et Leïlu ainsi que leurs époux : Fouad et Mourad
et à ma belle sœur Karima*

A mes frères :

Hichem et Ala-eddine, pour leur extrême serviabilité et compréhension

Aux trois anges de ma maison :

Mes nièces : Yasmine et Marwa et mon neveu Monder

A Mouna mon binome

A mes amies :

*Meriem, Isma, Samiha, Hannan, Khadidja, Naima, Amel, Akila, Nadjla et Amel
boudjnef.*

A toute ma famille et surtout mes cousines :

Ghania, Sarah, Amel, Asma, Imene, Wafa, Houda, Lamia et Fadhila.

A toute ma promotion

Mérim

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert
d'amour et d'affection*

A mes sœurs :

Souhila, Sabrina, Lamia et Sara ainsi que leurs époux : Amar, Ismail et Ibrahîm

A mes frères :

Ahmed, Kamel et Abdélhak, pour leur extrême serviabilité et compréhension

Aux anges de ma maison : mes nièces et mes neveux

A Mérièm mon binome

A mes amies :

Sara moumene, Isma, Samiha, Hannan, Khadidja, Amel boudjnehi, Naima,

Amel, Akila, Nadjla, Sara et Karima.

A toute ma famille et surtout mes cousines :

Alima, Nihed, Mounira, Rahma, Nedjwa, Amîna et Fouzia

A toute ma promotion

Mouna

Produced by www.scantopdf.eu

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail nous tenons à remercier tout d'abord et infiniment notre encadreur Pr. BEN OUARETH D.E. qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail, sa compétence et ses conseils pertinents ont été pour nous un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Nos remerciements les plus vifs s'adressent également à M^{me} AYAD H. de nous avoir fait bénéficier de sa précieuse aide, ses encouragements, ses conseils et sa bonne humeur, et d'avoir accepté la présidence du jury de ce mémoire.

Nous exprimons également notre reconnaissance à M^{me} BOUABID R. qui a accepté de participer à ce jury et de juger ce travail.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

Produced with Scantopdf

Sommaire

Introduction	1
1- Définition	2
2- Aspect physique	2
2-1- Énergie	2
2-2- Densité	2
2-3- Acidité	2
2-4- Température de congélation	3
3- Aspect chimique	3
3-1- Eau	5
3-2- Lipides	5
3-3- protéines	5
3-4- Glucides	5
4- Les éléments biologiques du lait	6
4-1- Les éléments cellulaires	6
4-2- Les micro-organismes	6
4-2-1- Les moisissures	6
4-2-2- Les levures	6
4-2-3- Les bactéries	7
4-2-4- Les bactériophages	7
1- Historique	8
2- Définition	8
3- Taxonomie	8
3-1- Classification classique	8
3-2- Classification moderne	9
3-3- Étude des genres	11
3-3-1- Genre <i>Lactobacillus</i>	11
3-3-2- Streptocoques et autres coques lactiques	12
4- Caractères bactériologiques	12
4-1- Caractères morphologiques	12
4-2- Caractères cultureux	12
4-3- Caractères physiologiques	13
4-4- Caractères biochimiques	14
5- Métabolisme énergétique des bactéries lactiques	15
5-1- Métabolisme des sucres	15
5-2- Métabolisme des protéines	17
5-3- Métabolisme du citrate	18
6- Potentiels d'utilisation des bactéries lactiques	19
6-1- Potentiel industriel	19
6-1-1- Rôle dans l'industrie laitière	19
6-1-2- Rôle dans la conservation des aliments	20
6-1-2-1- Production d'acide et diminution du pH	20
6-1-2-2- Production de peroxyde d'hydrogène	20
6-1-2-3- Production de bactériocines	20
6-2- Potentiel technologique	21
6-2-1- Production d'arômes	21
6-2-2- Production d'exopolysaccharides	21
6-3- Action probiotique	21
1- Echanges génétiques chez les bactéries	22

2-Historique de la transformation	22
3-Définition	24
4-Conditions de la transformation.....	24
5-Mécanisme de la transformation	24
5-1-Chez les bactéries Gram positif	24
5-2-Chez les bactéries Gram négatif	26
6-Types de la transformation	27
6-1- Transformation naturelle	27
6-2- Transformation artificielle	27
7- Interets de la transformation	28
I- Matériel et méthodes	29
I-1- Echantillons biologiques	29
I-2- Matériel	29
I-2-1- Milieux d'isolement	30
I-2-2- Milieux d'enrichissement	30
I-2-3- Milieux d'identification	30
I-3- Méthodologie	31
I-3-1- Isolement des souches lactiques	31
I-3-2- Identification des bactéries lactiques	31
I-3-3- Caractères industriels	35
I-3-4- Extraction de l'AND plasmidique	36
I-3-5- Electrophorese de l'ADN plasmidique	37
I-3-6- Transformation bactérienne	37
II- Résultats et discussion	38
II-1- Résultats d'isolement	38
II-1-1- A partir du lait cru	38
II-1-2- A partir du lait fermenté	38
II-2- Résultats d'identification	40
II-2-1- Résultats des tests biochimiques et physiologiques	40
II-2-2- Résultats des caractères industriels	43
II-3- Résultat du profil plasmidique	46
II-4- Résultats de la transformation	46
Conclusion	49

Produced by Scantopdf

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Caractéristiques physico-chimiques du lait de diverses espèces animales.	3
Tableau II	Composition chimique du lait de vache.	4
Tableau III	La classification fonctionnelle des bactéries lactiques.	9
Tableau IV	Aspect macromorphologique des colonies des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre.	13
Tableau V	Températures optimales de croissance des bactéries lactiques.	13
Tableau VI	Résultats d'isolement des bactéries lactiques à partir du lait de vache et du lait de chèvre.	39
Tableau VII	Résultats des tests d'identification des bactéries isolées.	41
Tableau VIII	Valeurs du pH après coagulation du lait.	44
Tableau IX	Résultats des caractères étudiés chez les espèces <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Leuconostoc sp.</i> avant et après transformation.	47

Liste des figures

Figure 1	La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire.	16
Figure 2	La protéolyse du lait par les bactéries lactiques.	17
Figure 3	Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques.	18
Figure 4	Les expériences de transformation de Griffith.	23
Figure 5	Transformation bactérienne chez les bactéries à Gram positif.	25
Figure 6	Coques lactiques isolées à partir du lait de vache cru sur milieu M17.	40
Figure 7	Coques lactiques isolés à partir du lait de vache fermenté sur milieu M17.	40
Figure 8	Streptocoques lactiques isolés à partir du lait de chèvre fermenté sur milieu M17.	40
Figure 9	Lactobacilles isolés à partir du lait de vache fermenté sur milieu MRS.	40
Figure 10	Activité aromatique chez l'espèce <i>Leuconostoc sp.</i>	43
Figure 11	Activité protéolytique des espèces <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Leuconostoc sp.</i> sur gélose au lait	44
Figure 12	Activité protéolytique des espèces <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Leuconostoc sp.</i> sur milieu M17 milk agar.	45
Figure 13	Activité protéolytique de l'espèce <i>Lactobacillus sp.</i> sur gélose au lait.	45
Figure 14	Activité protéolytique de l'espèce <i>Lactobacillus sp.</i> sur MRS milk agar	45
Figure 15	Résultat du profil électrophorétique de l'ADN plasmidique de l'espèce <i>Streptococcus thermophilus</i> .	46
Figure 16	Résultat du test de l'activité protéolytique chez <i>Leuconostoc sp.</i> avant et après transformation sur gélose au lait.	48

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

Asp : Acide aspartique.

BCPL : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.

BET : Bromure d'éthidium.

EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique.

IT.M.I : Institut Technologique Moyen d'Agriculture.

Lys : Lysine.

Mevag : Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides.

MRS : Man, Rogosa et Sharpe.

NL : Nickel et Leesment.

TSI : Tri-Sugar-Iron Agar.

Produced with ScanTOPDF

INTRODUCTION

Produced with ScanTOPDF

Introduction :

Depuis toujours, les bactéries lactiques sont avérées utiles à l'homme. Celui-ci les a regroupées dans un ensemble dont le nom est en lui-même évocateur de la caractéristique principale du métabolisme de ce groupe bactérien « la production d'acide lactique ». Outre la fermentation lactique, les activités protéolytique et aromatisante confèrent à ces bactéries un intérêt capital dans le domaine de la transformation et de la conservation des aliments.

Cependant, au cours des dernières années, on a assisté à un appauvrissement de la biodiversité des bactéries utilisées dans ces productions, ainsi beaucoup d'aspects restent encore à approfondir, en particulier au niveau de la connaissance de leur génétique et de leur métabolisme.

L'évolution de ces connaissances conduit à la sélection et au développement de nouvelles souches aux propriétés spécifiques afin d'apporter des réponses efficaces aux industries alimentaires.

C'est dans cette optique que ce travail a été réalisé. Il a concerné une étude sur le lait, les bactéries lactiques, leurs propriétés métaboliques et industrielles, leurs potentiels d'utilisation ainsi que le mode de transfert d'un caractère génétique entre des bactéries.

L'objectif de ce travail est de faire acquérir à une bactérie lactique le pouvoir acidifiant ainsi que l'activité protéolytique par un procédé génétique qui est la transformation, via un ADN plasmidique extrait à partir d'une autre bactérie lactique.

***PARTIE
THEORIQUE***

Produced with ScanPROF

LE LAIT

Produced with ScantOPDF

1- Définition :

Chez beaucoup d'espèces animales, le lien entre la mère et son petit n'est pas subitement rompu après la naissance et la femelle continue de nourrir sa progéniture. C'est ainsi toujours le cas chez les mammifères où durant une période donnée, l'unique aliment du nouveau né est le lait secrété par les glandes mammaires de la femelle (Penaud, 2006).

Le lait a été défini lors du premier Congrès International pour la Répression des Fraudes à Genève, en 1908, comme le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et être exempt de colostrum (1).

2- Aspect physique :

Le lait est un liquide de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre, selon la teneur en carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur est faible mais identifiable. Les principales constantes physico-chimiques du lait de diverses espèces animales sont présentées dans le tableau I (FAO, 1995).

2-1- Energie :

L'apport en énergie d'un litre du lait différencie les espèces animales considérées et est susceptible de large variation à l'intérieur d'une même espèce, cela étant, bien entendu, liée à la teneur en lipides du lait (FAO, 1995).

2-2- Densité :

Elle est proportionnelle à la concentration en matières sèches. Il ne faut pas perdre de vue que la matière grasse a une densité inférieure ou égale à 0,93 à 20 ° C, ce qui fait qu'un lait riche en matière grasse provoque une diminution de la densité (Houali, 1999).

2-3- Acidité :

Elle correspond à l'acide lactique provenant de la dégradation du lactose. Ceci donne lieu à une fourchette de pH qui fait qu'un lait est frais et bon pour la consommation et qu'un autre ne l'est pas (Houali, 1999).

2-4-Température de congélation :

C'est une notion assez variable selon l'espèce productrice, cette valeur présente un intérêt puisqu'elle permet d'apprécier la quantité d'eau rajoutée au lait (Houali, 1999).

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques du lait de diverses espèces animales (FAO, 1995).

Constantes	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait de brebis
Energie (kcal/litre)	705	600-750	1100
Densité du lait entier à 20 °C	1,026-1,033	1,027-1,035	1,034-1,039
Point de congélation (°C)	-0,520_ -0,550	-0,550_ -0,583	-0,570
pH-20 °C	6,6-6,8	6,45-6,6	6,5- 6,85
Acidité titrable (°Dornic)	15-17	14-18	22-25
Conductivité électrique à 25 °C (siemens)	45x10 ⁻⁴	43-56x10 ⁻⁴	38x 10 ⁻⁴

3- Aspect chimique:

La composition du lait est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants (1). Quatre composants sont dominants du point de vue quantitatif, leurs concentrations varient selon les races des animaux producteurs, l'alimentation et l'environnement (2), il s'agit de l'eau, des lipides, des protéines et des glucides, les composés mineurs sont représentés par les matières minérales, les enzymes, les vitamines et les gaz dissous (1). Le tableau II résume la composition chimique moyenne du lait de vache.

Tableau II : Composition chimique du lait de vache (Corrieu et Luquet, 2008).

Composants	Concentrations (g/l)
Eau	905
Glucides (lactose)	49
Lipides :	35
dont matière grasse	34
dont lécithine (phospholipides)	0.5
dont partie insaponifiable (stérols, carotène, tocophérols)	0.5
Protides :	34
dont caséines	27
dont protéines solubles (globulines, albumines)	5.5
dont substances azotées non protéique	1.5
Sels :	9
dont acide citrique	2
dont acide phosphorique	2.6
dont chlorure de sodium	1.7
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces

3-1- Eau :

L'eau représente environ 81 à 87% du volume du lait, Elle se trouve sous deux formes: l'eau libre (96 % de la totalité) et l'eau liée à la matière sèche (4 %). L'eau libre par sa mobilité est très réactive, elle autorise l'état de solution du lactose et d'une partie des minéraux et rend le milieu très favorable au développement des microorganismes. L'eau liée est fortement associée aux protéines, à la membrane des globules gras et à certains sels minéraux (1).

3-2- Lipides :

Leur concentration dans le lait varie de 30 à 50 g/L, et vaut en moyenne 39 g/L. Le lait de consommation est standardisé à un taux de matière grasse fixé chaque année par la loi (36 g/L en 1980). Elles sont constituées essentiellement (99 %) de triglycérides (3).

3-3- protéines :

Les caséines constituent environ 80 % de la matière protéique du lait (4). Il s'agit de polypeptides complexes, qui résultent de la polycondensation de différents acides aminés, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine (3). Elles sont sensibles aux pH acides (ex : acide lactique) et aux enzymes coagulantes (ex : présure) (4).

3-4- Glucides :

Le lactose est le sucre caractéristique du lait, il est responsable par son goût sucré et par sa concentration élevée de la saveur douce et agréable du lait frais. Il est fermentescible par de nombreux micro-organismes qui sont impliqués dans la fabrication de nombreux produits laitiers (1).

4- Les éléments biologiques du lait :

Parmi ces éléments on peut distinguer :

- Les cellules sanguines et les cellules de la glande mammaire.
- Les micro-organismes qui tapissent le canal du trayon (Houali, 1999).

4-1- Les éléments cellulaires :

En plus des cellules épithéliales, on distingue les leucocytes, leur détermination et quantification renseigne sur la valeur hygiénique du lait. On parle ainsi du rapport m/p (mononucléaires/polynucléaires), dans un lait normal ce rapport est voisin de 1 et toujours supérieur à 0,5 (Houali, 1999).

4-2- Les micro-organismes :

Un lait normal à la sortie du trayon contient entre 10^2 et 3.10^3 germes/ml. Le trayon est le siège d'un développement de différents micro-organismes parmi lesquels on peut distinguer :

4-2-1- Les moisissures :

C'est le cas des Phycomycètes, fungi imperfecti, Ascomycètes ainsi que les Siphomycètes qui regroupent essentiellement les genres *Mucor* et *Rhizopus*. Parmi les ascomycètes on a les aspergillus et penicillium puis on a les fungi imperfecti dont les genres sont *Geotrichum*, *Monilia* et *Cladosporum*. La plupart de ces moisissures sécrètent des lipases et des protéases (Houali, 1999).

4-2-2- Les levures :

Nous pouvons distinguer deux grandes familles :

- *Endomycetaceae* : les plus importantes sont *Saccharomyces fragilis* et *Saccharomyces laetis* qui transforment le lactose en alcool, se rencontrent dans les laits fermentés et se développent bien dans le lactosérum.

- *Cryptococaceae* : fermentent difficilement les sucres, les genres les plus fréquents dans le lait sont *Candida* et *Rhodotorula*. *Candida utilis* a été sélectionnée pour sa richesse en vitamines et en graisses et ce pour la production de levures alimentaires, les *Rhodotorulas* sont rencontrés dans les saumures et la croûte des fromages à pâte molle (Houali, 1999).

4-2-3-Les bactéries :

Ces micro-organismes regroupent les bactéries lactiques à savoir les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* (Houali, 1999) ainsi que les bactéries dites de contamination tels que : les staphylocoques, d'autres streptocoques et les entérobactéries (FAO, 1995).

4-2-4-Les bactériophages :

Ce sont des virus parasites des bactéries, les bactéries lactiques peuvent être parasitées par ces derniers provoquant un arrêt brutal de l'acidification. Ces bactériophages présentent une spécificité vis-à-vis de l'espèce et même vis-à-vis de la souche (Houali, 1999).

***LES BACTERIES
LACTIQUES***

Produced with Scan PDF

1- Historique :

L'essor des bactéries lactiques a bénéficié de celui des grands mammifères producteurs de lait, il s'est accentué lorsque l'homme est passé du statut de chasseur cueilleur à celui d'éleveur, il y a quelques 8 000 ans avant J.-C. (5).

Il fallait attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873. Metchnikoff isole en 1904 « le Bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (Penand, 2006). Cependant, ce groupe bactérien n'a été défini qu'en 1919 par Orla Jensen (Leuveau et Bouix, 1993).

2- Définition :

Les bactéries lactiques ou BL regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes. Ce sont des cellules autonomes, hétérotrophes et chimioorganotrophes dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides (6). Elles sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*...), la peau (*Lactococcus*), les muqueuses humaines et animales (*Lactobacillus*), et dans le tractus digestif (*Lactobacillus*) où elles accomplissent de nombreuses fonctions : elles créent notamment un environnement hostile aux bactéries pathogènes (6, 7).

3- Taxonomie :

3-1- Classification classique :

La taxonomie des bactéries lactiques évolue depuis la première classification d'Orla Jensen (1919), qui a été basée sur leur mode de fermentation, leur morphologie, et leur température de croissance (Tab. III), (Teuber, 1992).

Tableau III : La classification fonctionnelle des bactéries lactiques (Orla Jensen, 1919).

	Hétérofermentaire	Homofermentaire
Bâtonnets	Betabactéries : <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus kefisi</i>	Streptobactéries : <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> Thermobactéries : <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. Bulgaricus</i> <i>ssp. Lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>ssp. Cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. Lactis</i> <i>ssp. Diacetylus</i> <i>Pediococcus sp.</i>
Cocci		Thermophiles

3-2- Classification moderne:

Cette classification est basée sur la composition de la paroi et des molécules porteuses de l'information génétique :

❖ Composition de la paroi :

La paroi des bactéries Gram positif contient différents types de peptidoglycane, qui diffèrent par la séquence d'acides aminés de la fraction peptidique du peptidoglycane (PTG) par exemple la séquence Lys-D-Asp est celle qui prédomine au sein du genre *Lactobacillus* (Corrieu et Luquet, 2008).

❖ Composition en base de l'ADN (GC%) :

Le contenu GC% des bactéries lactiques varie d'une espèce à une autre :

Streptococcus (Str) = GC% = 34-46%

Pediococcus (Pd) = GC% = 34-42%

Leuconostoc (Ln) = GC% = 36-43%

Lactobacillus (Lb) = GC% = 32-53% (Leuveau et Bouix, 1993).

❖ Homologie ADN/ADN et ADN/ARN :

L'homologie entre les souches est établie par des techniques d'hybridation exp. pour les espèces *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus diacetylactis*, leur génome s'hybride fortement de 66-100 % selon les souches (Leuveau et Bouix, 1993).

❖ Séquence nucléique de l'ARNr 16S :

L'analyse de la séquence nucléotidique de l'ARN ribosomique (ARNr 16S) des bactéries lactiques permet de réunir dans un même grand groupe phylogénétique les genres : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* (Leuveau et Bouix, 1993).

❖ Profil plasmidique :

La majorité des bactéries lactiques contiennent des plasmides dans leurs cellules qui codent généralement pour les caractères suivants :

- La résistance à des antibiotiques tels que la tétracycline et l'érythromycine.
- Le métabolisme glucidique en particulier le métabolisme du lactose.
- Le métabolisme protéique.
- Permiasé au citrate (Corrieu et Luquet, 2008).

3-3- Etude des genres :

Le groupe de bactéries lactiques se subdivise en plusieurs genres :

Lactobacillus, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc* (Seppo, 2004 ; Boudjema, 2008).

3-3-1- Genre *Lactobacillus* .

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques et se subdivise en trois groupes :

- **Groupe de Thermobactérium** : Il comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *L.helveticus*, *L.jugurti*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.delbrueckii* etc ... (Guiraud, 2003).
- **Groupe de Streptobactérium** : Il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15 °C (ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat). Il comporte les espèces *L.casei* qui est le lactobacille prédominant du lait, *L.plantarum* rencontré dans la choucroute, *L.curvatus*, *L.sakei*, *L.acetotolerans*, *L.graminis*, *L.rhamnosus* etc... (Guiraud, 2003).
- **Groupe de Betabactérium** : Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L.fermentum*, *L.buchneri*, *L.brevis*, *L.viridiscens*, *L.kefir*, *L.fructivorans*, *L.sanfrancisco* etc... (Guiraud, 2003).

3-3-2- Streptocoques et autres coques lactiques :

La famille des Streptococcaceae regroupe des genres très fréquents dans l'industrie alimentaire comme agents de fermentation lactique : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (ces trois genres étant anciennement regroupés en un genre unique *Streptococcus*), *Leuconostoc* et *Pediococcus*... La différence entre ces genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique) (Guiraud, 2003).

4- Caractères bactériologiques :

4-1- Caractères morphologiques :

Ce sont des bactéries Gram-positive, jamais sporulées (Leuveau et Bouix, 1993). On distingue principalement selon la forme de la cellule:

- ✓ **Les coques (cocci):** sont des sphères ovoïdes, de 0.5-1.5 μm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades, des chaînettes ou des amas, c'est le cas par exemple des genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. (Leuveau et Bouix, 1993 ; Boudjema, 2008).
- ✓ **Les bacilles:** sont des bactéries en forme de bâtonnets de 0.5-2 μm de diamètre et 1.5-10 μm de longueur et qui peuvent s'incurver ou s'allonger en filaments. A côté des bâtonnets droits classiques, on peut trouver des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles, c'est le cas de *Lactobacillus* (Leuveau et Bouix, 1993 ; Boudjema, 2008).

4-2- Caractères cultureux :

Les bactéries lactiques ont de nombreuses exigences nutritionnelles (substrats carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments), c'est la raison pour laquelle on utilise généralement des milieux riches afin de les cultiver, les plus utilisés d'entre eux sont la gélose MRS, MI7 et NL etc... (Corrieu et Luquet, 2008). Il est possible de mettre en évidence les caractères cultureux suivants (Tab. IV) :

Tableau IV : Aspect macromorphologique des colonies des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre (Badis *et al.*, 2005).

Genre	Macromorphologie
Streptocoques	Colonies blanches, rondes ou lenticulaires.
Lactocoques	Colonies blanches, rondes ou lenticulaires.
Leuconostocs	Colonies transparentes très petites, rondes.
Pediocoques	Colonies lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres.
Lactobacilles	Petites colonies blanches bombées.

4-3- Caractères physiologiques :

- ✓ Les BL sont généralement immobiles et aérotolérantes, cependant certaines espèces habitant par exemple le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes (Bourgeois et Larpant, 1996).
- ✓ Elles se composent d'espèces mésophiles, dont la température optimale de croissance est proche de 30 °C, et d'espèces thermophiles, dont la température optimale est proche de 42 °C. Le tableau V indique les valeurs de la température optimale de croissance des principaux genres de bactéries lactiques (Corrieu et Luquet, 2008).

Tableau V : Températures optimales de croissance des bactéries lactiques (Corrieu et Luquet, 2008).

Genre ou espèce	Températures optimales
<i>Carnobacterium</i>	22-30 °C
<i>Leuconostoc</i>	18-30 °C
<i>Vagococcus</i>	25-30 °C
<i>Lactococcus</i>	27-32 °C
<i>Pediococcus</i>	25-40 °C
<i>Lactobacillus</i> (mésophiles)	30-35 °C
<i>Enterococcus</i>	30-40 °C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	42-43 °C
<i>Lactobacillus</i> (thermophiles)	40-45 °C

- ✓ Leur croissance est fortement influencée par le pH du milieu. Les valeurs de pH optimales de croissance sont généralement entre 6 et 6,5 pour les Lactocoques, *Leuconostocs* et *Streptococcus thermophilus*, et entre 5,5 et 6,0 pour les Lactobacilles (Corrieu et Luquet, 2008).

4-4- Caractères biochimiques :

- Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème, cependant, grâce à des flavoprotéines, oxydases ou peroxydases, elles peuvent réaliser des oxydations limitées non phosphorylantes (Bourgeois et Larpant, 1996).
- L'absence de la catalase est une caractéristique des bactéries lactiques, mais certaines espèces acquièrent une activité catalasique sur des milieux riches en hème (Bourgeois et Larpant, 1996).
- Elles sont généralement nitrate-réductase négatives, en plus de cela ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (6).
- L'activité lipolytique des bactéries lactiques est faible et *Lactobacillus bulgaricus* semble être le plus actif. La capacité d'hydrolyse vis-à-vis des triglycérides du lait est très limitée. Le rôle lipolytique des bactéries lactiques thermophiles pendant l'affinage n'intervient en fait que lorsque la matière grasse est en grande partie dégradée par la lipase naturelle du lait ou celle d'autres microorganismes (Houali, 1999).
- Elles fermentent des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (manitol, sorbitols, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose) (Corrieu et Luquet, 2008).
- Elles possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (Roudj *et al.*, 2009).

5- Métabolisme énergétique des bactéries lactiques :

5-1- Métabolisme des sucres :

Les sucres utilisés par les bactéries lactiques sont fermentés essentiellement en acide lactique. Pour pénétrer dans la cellule, ces sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire. Deux systèmes de transports actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoénol-pyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Georges et Luquet, 2008). La fermentation lactique s'effectue selon deux voies (Fig.1):

- ✓ Voie d'Embden-Meyerhof : homofermentation, dont laquelle l'acide lactique est le principal ou le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat (6).
- ✓ Voie de Dickens-Horecker : hétérofermentation, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le CO₂, acide acétique, éthanol... (6).

Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre utilisé (Leveau et Bouix, 1993).

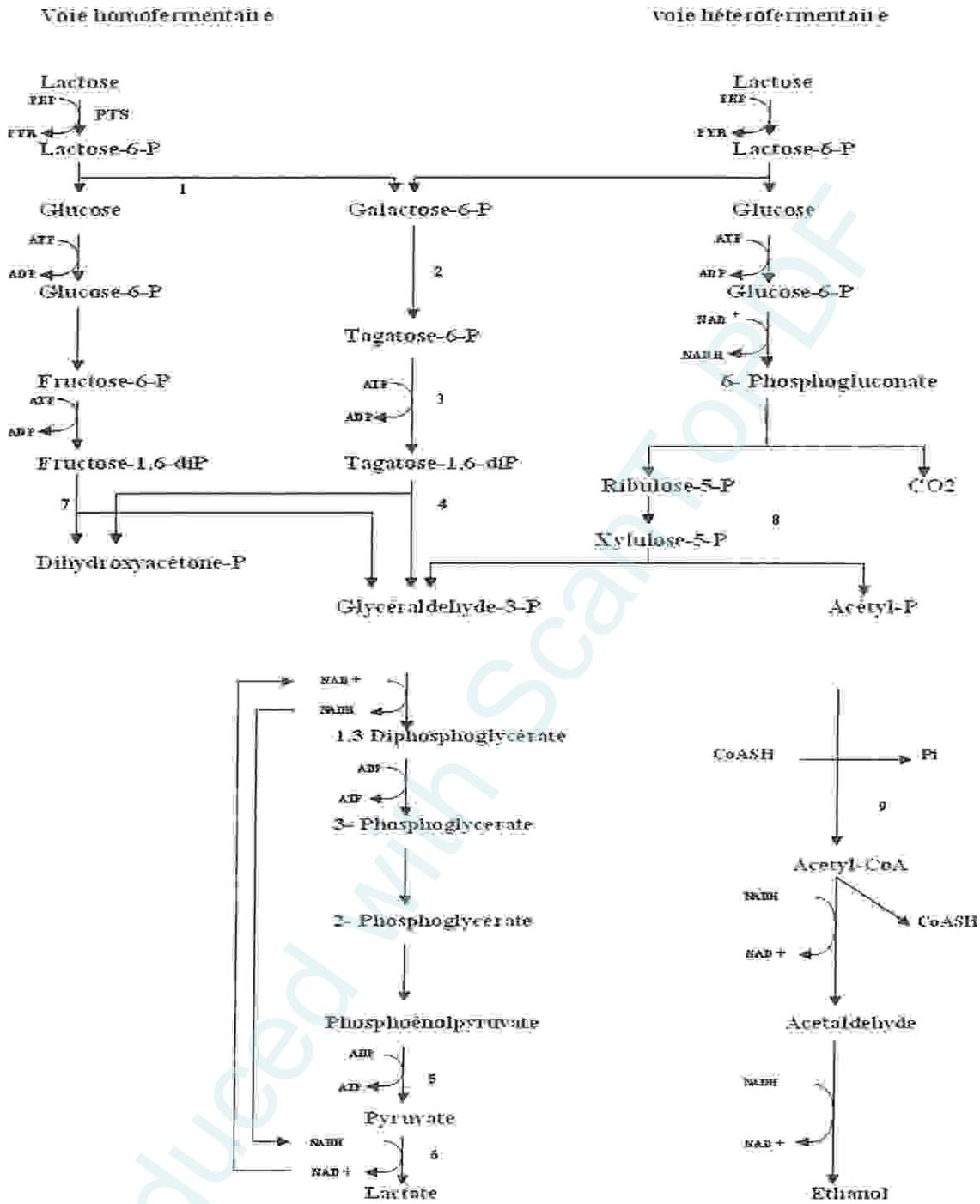


Figure 1 : La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire (Leveau et Bouix, 1993).

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

5-2- Métabolisme des protéines :

Après l'utilisation des acides aminés et des peptides libres, les bactéries lactiques doivent, pour croître dans le lait, hydrolyser les protéines. Le système protéolytique de ces bactéries est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases capables d'hydrolyser des protéines natives par exemple les caséines ou leurs dérivés et les peptidases détectées par l'hydrolyse de peptides issus de la dégradation des protéines. Ces enzymes peuvent être intracellulaires ou liées à la paroi bactérienne (Leuveau et Bouix, 1993). Les enzymes intracellulaires peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne liée à l'âge de la cellule ou aux conditions physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi (Roudj *et al.*, 2009). La protéolyse du lait par les bactéries lactiques est résumée dans la figure 2.

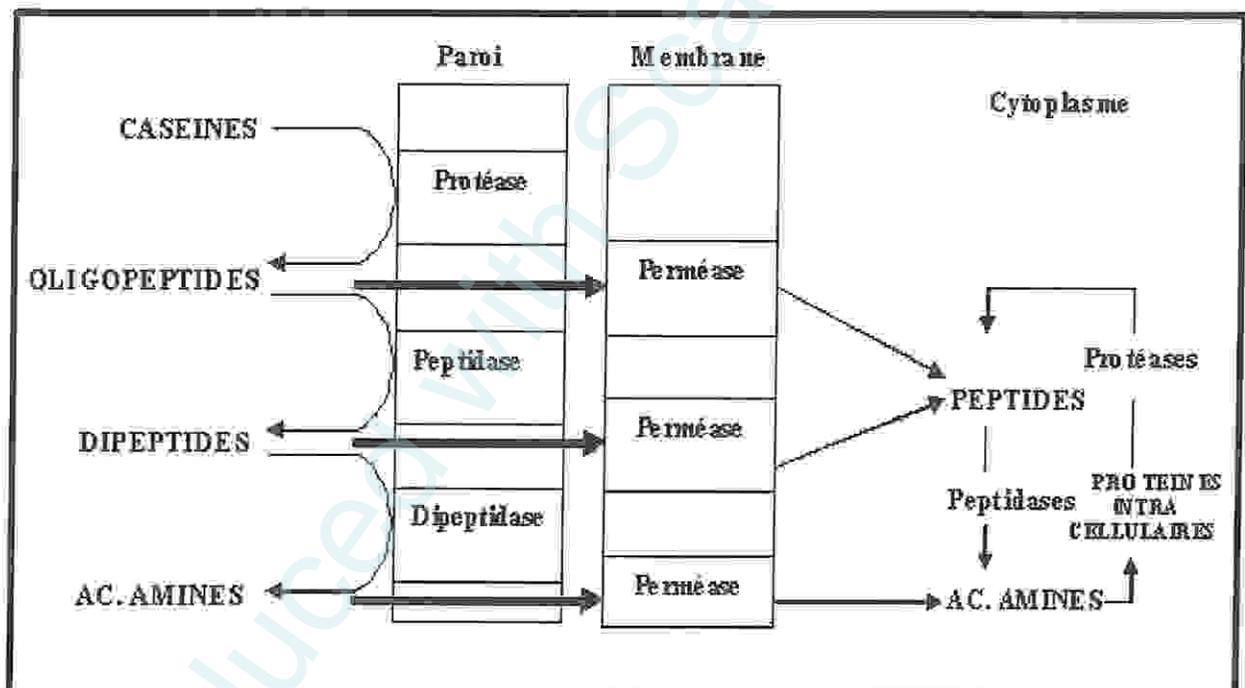


Figure 2 : La protéolyse du lait par les bactéries lactiques (Leuveau et Bouix, 1993).

5-3-Métabolisme du citrate :

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate perméase où il est scindé en acétate et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate lyase. L'oxaloacétate est converti en pyruvate et en CO_2 par une oxaloacétate décarboxylase. Du 2,3 butylène glycol peut être produit à partir de l'acétoïne par l'acétoïne réductase. Le citrate réprime la synthèse de cette enzyme ainsi que celle de la diacétyle réductase, ce qui peut expliquer l'accumulation de diacétyle ou de l'acétoïne dans les cultures de biovar *diacetylactis* (Fig.3), (Houali, 1999).

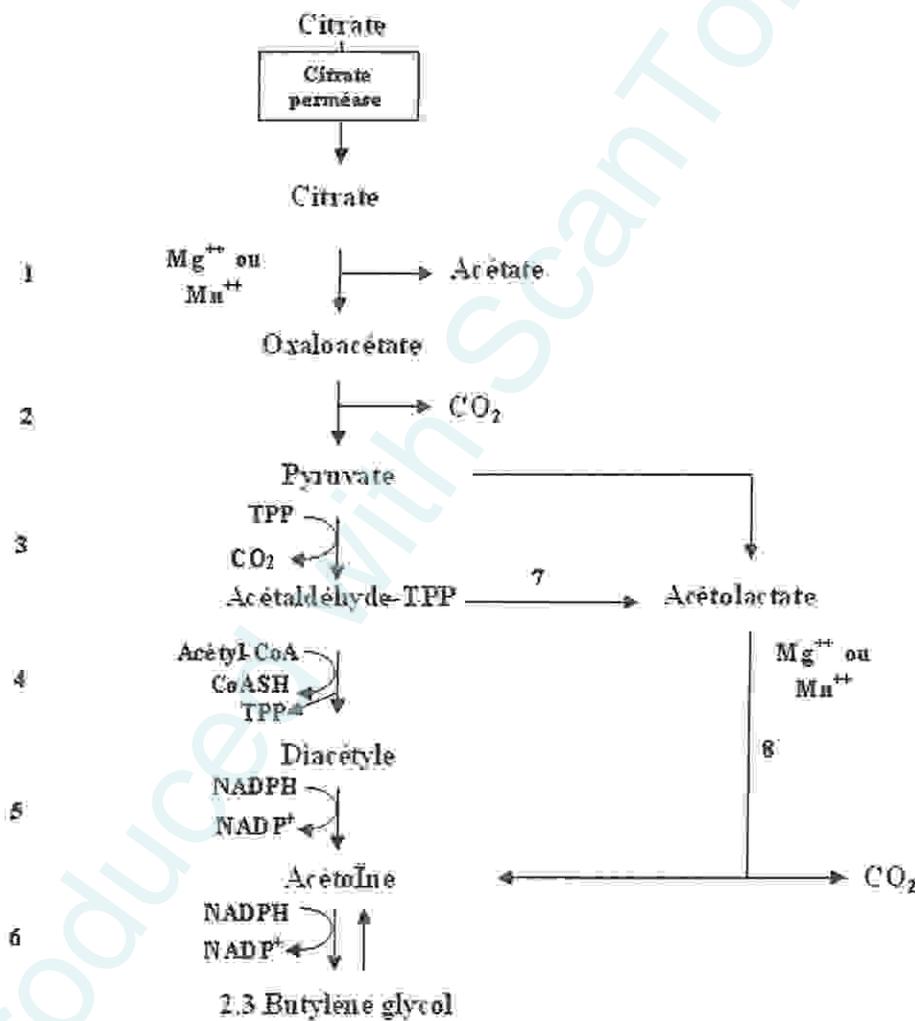


Figure 3 : Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques (Leuveau et Bouix, 1993).

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

6- Potentiels d'utilisation des bactéries lactiques :

6-1- Potentiel industriel :

En produisant de l'acide lactique, les bactéries lactiques modifient le milieu dans lequel elles se trouvent. Cette fermentation lactique est utilisée dans la fabrication de nombreux produits fermentés tels que : les produits laitiers (yaourt, fromage ...), l'alcool (vin, cidre, bière), charcuteries (jambon, saucissons), pains au levain etc... La fermentation modifie les textures et les saveurs des aliments d'origine et en améliore la conservation (8).

6-1-1- Rôle dans l'industrie laitière :

Depuis leur découverte, les bactéries lactiques sont utilisées pour fabriquer des produits laitiers. Si cette pratique était à l'origine intuitive, ses bases scientifiques sont aujourd'hui mieux comprises (8).

❖ Fabrication du yaourt :

Le yaourt est un lait fermenté issu de la transformation du lait par les seules bactéries *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. L'utilisation combinée de ces deux espèces fait apparaître une interaction indirecte positive appelée protocoopération (Corrieu et Luquet, 2008). L'espèce *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* est plus protéolytique que *Sc. thermophilus* fournit les acides aminés et/ou les peptides dont cette souche a besoin et stimule ainsi sa croissance. En retour, la croissance de l'espèce *Sc. thermophilus* en l'absence ou à faible concentration d'oxygène produit de l'acide formique stimulant le développement de *Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus* (Leuveau et Bouix, 1993).

❖ Fabrication des fromages :

Elle se déroule en plusieurs étapes et fait intervenir les genres lactiques suivants : *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (8).

6-1-2- Rôle dans la conservation des aliments :

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la conservation des produits alimentaires, elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (6).

6-1-2-1-Production d'acide et diminution du pH :

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide (6).

6-1-2-2-Production de peroxyde d'hydrogène :

La production et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène créent un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé. Son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent de peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (6).

6-1-2-3-Production de bactériocines :

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tel que *Listeria monocytogenes* (Dortu et Thonart, 2009).

D'autres agents antimicrobiens sont aussi produits tels que : Le dioxyde de carbone (CO₂), le diacétyle et l'acétaldéhyde (6).

6-2- Potentiel technologique :

6-2-1- Production d'arômes :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arôme qui participent aux qualités organoleptiques des fromages, la plupart de ces composés sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (6).

6-2-2- Production d'exopolysaccharides :

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucres appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini. En général la présence de polysaccharides dans des produits fermentés tels les yaourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (6).

6-3- Action probiotique :

A partir des travaux de Teissier en 1906 et de Metchnikoff en 1908, l'idée que les bactéries lactiques ingérées vivantes pouvaient avoir un effet probiotique a été développée. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier (Corrieu et Luquet, 2005). Pour cette raison, ces bactéries sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale. Parmi leurs effets bénéfiques, on peut citer :

- Inhibition du développement et de la synthèse de toxines par les microorganismes pathogènes.
- Propriétés antitumorales dues à l'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogène dans le tractus gastro-intestinal.
- Prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales.
- Excrétion de la β -galactosidase notamment par les *Lactobacillus* et qui est souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte facilitant ainsi la digestion du lactose (6).

*LA
TRANSFORMATION
GENETIQUE*

Produced with Scantopdf

1- Echanges génétiques chez les bactéries :

Le brassage de l'information génétique au sein d'une population est un des éléments essentiels de son évolution. Chez les organismes supérieurs, ce brassage est assuré par la fusion des gamètes lors de la reproduction sexuée. Les bactéries n'ont pas de reproduction sexuée, mais différents phénomènes leur permettent de transférer du matériel génétique: directement ou indirectement, vers des bactéries réceptrices dans lesquelles il peut être substitué au matériel génétique homologue, à la suite d'une recombinaison. Ceci peut se faire par trois mécanismes différents: La transformation, dont laquelle la cellule bactérienne absorbe de l'ADN présent dans l'environnement ; la conjugaison, où l'ADN est transféré via un plasmide d'une cellule bactérienne à une autre ; et la transduction, où un bactériophage emporte de l'ADN bactérien d'une cellule à une autre (Cuinin, 1993).

La possibilité de détecter des micro-organismes ayant réalisé un de ces trois mécanismes dépend de l'expression du ou des gènes intégrés dans la cellule hôte. Souvent ces gènes deviennent des éléments du patrimoine génétique bactérien et les caractères acquis par cet échange génétique sont transmis aux cellules filles après division cellulaire (Jorome *et al.*, 2004).

2-Historique de la transformation:

En 1928, Frederick Griffith démontre que l'inoculation sous-cutanée à la souris d'un mélange de pneumocoques capsulés (virulents) tués par la chaleur et de pneumocoques acapsulés (non virulents) vivants, entraîne une septicémie mortelle à pneumocoques capsulés vivants. Il y a donc eu transformation ou « réversion » des pneumocoques acapsulés (R) en pneumocoques capsulés (S). En 1944, Avery, MacLeod et McCarty démontrent que le « principe transformant » est l'ADN bactérien, ils réussissent à reproduire *in vitro* la transformation en présence d'ADN fortement polymérisé. L'activité transformante est perdue en présence de désoxyribonucléase (9), mais pas après une exposition à des protéases ni à des ARNases (enzymes qui détruisent respectivement les protéines et les ARNs) (Fig. 4), (Jorome *et al.*, 2004).

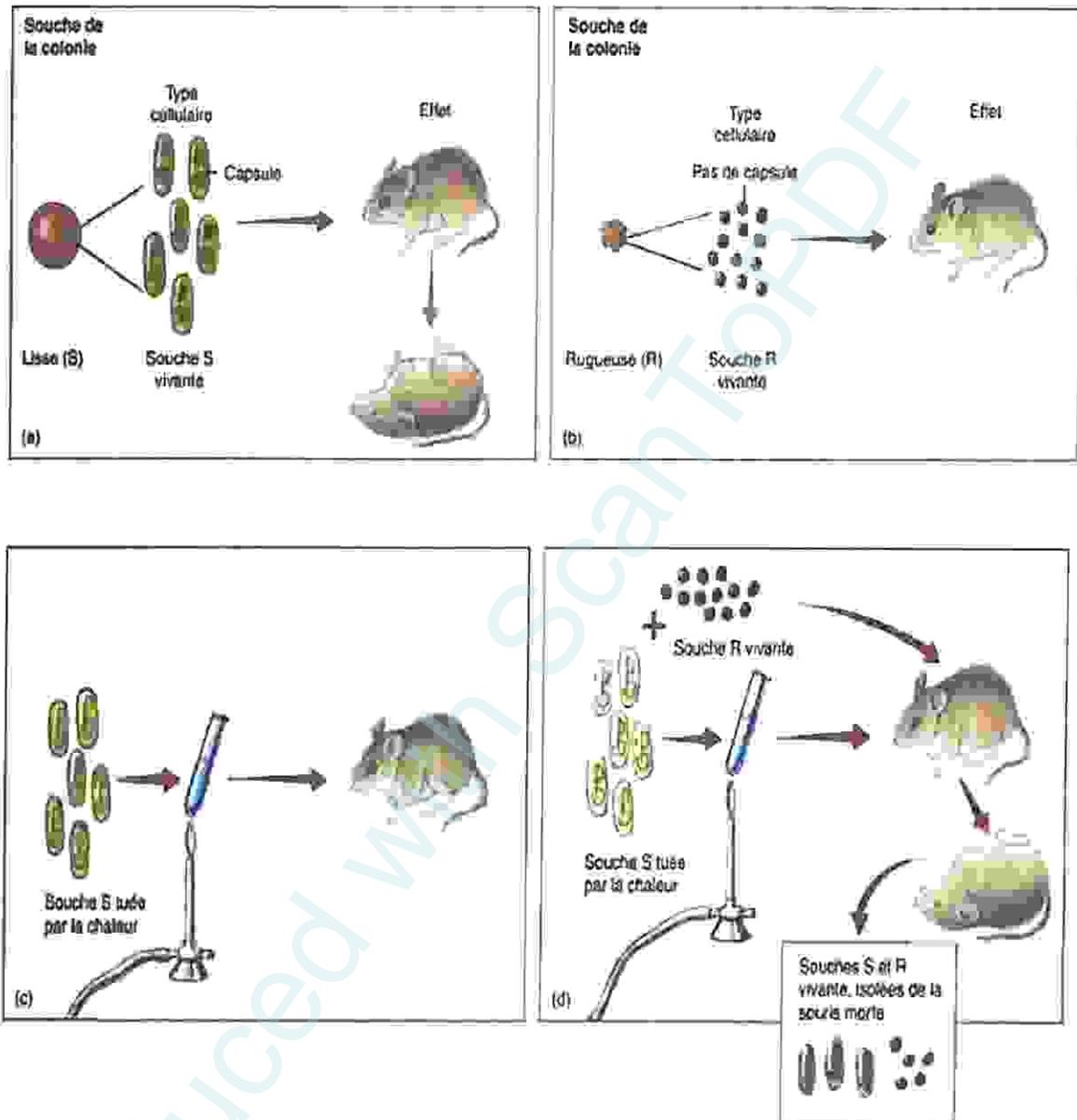


Figure 4 : Les expériences de transformation de Griffith (Madigan et Martinko, 2007).

(a) Les souris meurent de pneumonie après injection de pneumocoques de souche S, qui possèdent une capsule et forment des colonies lisses. (b) Les souris survivent après injection de pneumocoques non pathogènes R, qui ne possèdent pas de capsule et forment des colonies rugueuses. (c) L'injection de pneumocoques S tués à la chaleur, reste sans effet, (D) Les souris développent une pneumonie après injection de bactéries R vivantes et bactéries S tuées ; on retrouve dans les souris mortes des bactéries vivantes de type S.

3-Définition :

La transformation est un phénomène complexe qui débute par la capture d'un ADN donneur exogène par des bactéries qui se trouvent dans une situation physiologique particulière dite de compétence, et se terminent par l'expression par la cellule réceptrice de propriétés codées par l'ADN donneur (Cuinin, 1993).

4-Conditions de la transformation:

- La cellule réceptrice doit être dans un état de compétence: La compétence de transformation est caractérisée par un état membranaire particulier durant lequel la paroi généralement relativement rigide peut permettre le transport de macromolécules d'ADN relativement grosses (Jorome *et al.*, 2004).
- L'ADN transformant doit être bicaténaire (aucune transformation n'est possible avec un ADN monocaténaire) (10).
- L'ADN doit être libre, nu et en solution, sa taille joue un rôle déterminant (10).

5-Mécanisme de la transformation :**5-1-Chez les bactéries Gram positif :**

Chez les bactéries à Gram positif, l'état de compétence nécessite l'apparition à la surface de la cellule d'un complexe protéique constitué d'une endonucléase, d'une exonucléase, de polypeptides capables de lier l'ADN et d'une autolysine qui augmente la perméabilité cellulaire et permet au complexe protéique de gagner la surface cellulaire. L'ADN bicaténaire présent dans le milieu extérieur peut alors être capté, il est découpé par l'endonucléase en fragments d'environ 15 Kpb, puis l'exonucléase dégrade l'un des deux brins d'ADN alors que le deuxième brin pénètre dans le cytoplasme où il peut être recombinaisonné avec le chromosome (Fig. 5), (10).

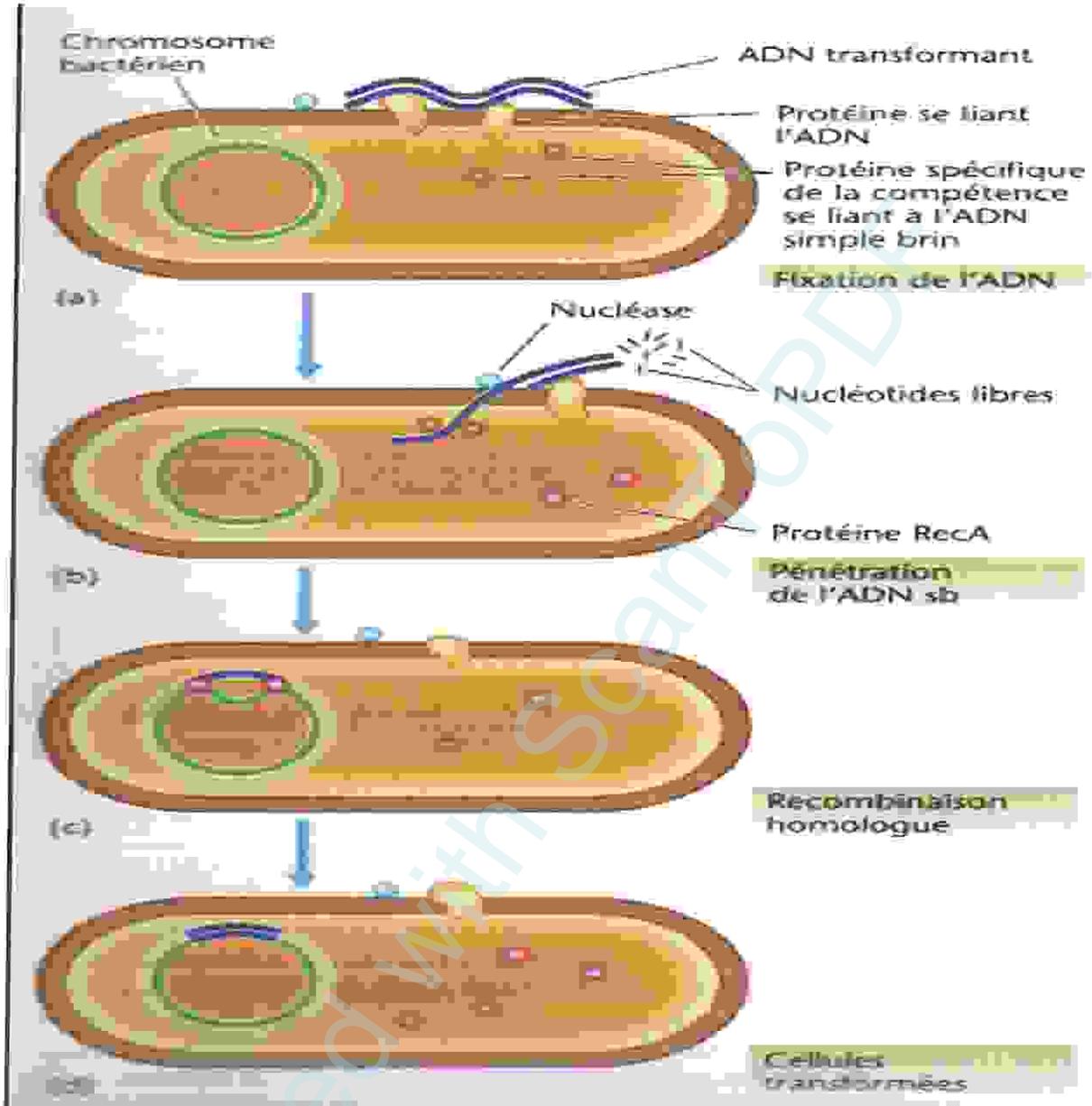


Figure 5 : Transformation bactérienne chez les bactéries à Gram positif (Jorome *et al.*, 2004).

(a) Adsorption d'un ADN double brin grâce à une protéine membranaire liant l'ADN. (b) Pénétration d'un des deux brins dans la cellule tandis qu'une nucléase dégrade l'autre brin. (c) Le simple brin dans la cellule s'associe avec des protéines spécifiques et la recombinaison avec des régions homologues du chromosome bactérien est réalisée sous le contrôle de la protéine RecA. (d) Cellules transformées.

5-2-Chez les bactéries Gram négatif :

Chez ce type de bactéries, les mécanismes sont proches, mais il existe deux différences essentielles :

- L'état de compétence et la capture de l'ADN sont associés à la présence de petites vésicules membranaires, appelées transformasomes, et qui font saillie à l'extérieur de la cellule. L'ADN transformant est capturé par ces vésicules et il est transporté dans l'espace périplasmique. Dans l'espace périplasmique il est dégradé et un unique brin d'ADN gagne le cytoplasme avant d'être incorporé au chromosome (10).
- La capture de l'ADN exogène nécessite la reconnaissance de séquences spécifiques de 10 à 11pb. Par exemple, la séquence AAGTGCGGTCA pour *Haemophilus influenzae* ou la séquence GCCGTCTCAA pour *Neisseria gonorrhoeae*. Des séquences d'une telle longueur ont peu de chance d'être présentes sur de nombreuses molécules d'ADN ce qui confère une certaine spécificité à la transformation (seul des ADN spécifiques peuvent être transformants) (10).

6-Types de la transformation :

6-1- Transformation naturelle :

La transformation naturelle peut s'observer chez un nombre limité d'espèces bactériennes à Gram positif (*Streptococcus*, et *Leuconostoc carnosum*) (Corrieu et Luquet, 2008), ou à Gram négatif (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*). Pour d'autres bactéries, aucune transformation naturelle n'a été observée, mais il est possible d'obtenir une transformation artificielle (10).

6-2- Transformation artificielle :

La transformation artificielle est d'un usage courant dans les laboratoires de biologie moléculaire. Elle a pour but de transférer diverses molécules d'ADN à des bactéries non naturellement transformables. La bactérie réceptrice est alors utilisée pour amplifier l'ADN exogène qui est souvent un plasmide. Pour rendre compétente la bactérie réceptrice, on utilise des techniques permettant de perforer les enveloppes bactériennes. Une de ces techniques consiste à placer les bactéries et l'ADN transformant dans un milieu riche en calcium et à soumettre le mélange à un choc thermique (chauffage à 42 °C suivi d'un refroidissement brutal dans la glace). Une autre technique classique est celle de l'électroporation qui consiste à soumettre les bactéries à des impulsions électriques à haute tension ayant pour but de créer des pores dans les enveloppes bactériennes (10).

7- Intérêts de la transformation:

- Ce mode de transfert a un grand intérêt historique : L'ADN est bien le support chimique de l'hérédité, et non les protéines (11).
- Il a permis l'établissement des premières cartes génétiques partielles chez les bactéries, et donc des études plus précises sur la virulence, la résistance aux antibiotiques (11).
- La transformation permet le transfert d'un ou plusieurs caractères d'une souche bactérienne vers une autre :
 - La résistance aux antibiotiques telle que la résistance à l'érythromycine, streptomycine etc...
 - La synthèse des enzymes impliqués dans l'amélioration métabolique (Clows, 1973).
- La découverte ultérieure de la transformation artificielle a permis alors de transférer divers ADN sous forme de chimère ou hybride comme un plasmide sur lequel sont clonés des gènes bactériens, animaux ou humains à des bactéries non transformables naturellement comme *E. coli* (11).
- Dans le domaine médical, l'intérêt de la transformation est lié à l'émergence d'espèces résistantes aux antibiotiques comme *Streptococcus pneumoniae*, d'autres streptocoques, *Neisseria meningitidis* ou des *Staphylococcus spp.* Ainsi, le traitement antibiotique d'une infection rhino-pharyngée peut conduire à la sélection de souches résistantes de streptocoques commensaux susceptibles de transmettre, par transformation, les gènes de résistance à *Streptococcus pneumoniae* (10).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Produced with ScanPROF

MATERIEL ET METHODES

Produced with ScanTopDF

La partie pratique de ce travail a été réalisée dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie du département de Biologie à l'université 08 mai 1945 à Guelma.

Sachant que les bactéries lactiques peuvent différer par un certain nombre de propriétés intéressantes pour l'industrie laitière, telles que leur vitesse d'acidification, leur activité protéolytique et aromatique. Les bactéries utilisées à cet effet devraient avoir des propriétés répondant aux exigences d'une fabrication fiable et de qualité choisit selon leurs caractéristiques industrielles, mais aussi selon des critères génétiques.

Nous allons pour cela essayer d'isoler des bactéries lactiques à partir des échantillons du lait, d'étudier et de comparer leurs propriétés industrielles, et enfin, transformer génétiquement l'une de ces bactéries.

I- Matériel et méthodes :

I-1- Echantillons biologiques :

Nos essais ont porté sur 4 échantillons du lait :

- 2 échantillons du lait de vache (1 cru, 1 fermenté).
- 2 échantillons du lait de chèvre (1 cru, 1 fermenté).

Les échantillons prélevés des deux sites : Guelma (I.T.M.A.), prioritaire privé, sont transportés jusqu'au laboratoire dans des conditions d'asepsie satisfaisantes.

I-2- Matériel :

Le matériel utilisé et la composition des milieux utilisés pour l'isolement et l'identification des bactéries lactiques sont présenté en annexe I et II respectivement.

I-2-1- Milieux d'isolement :

- **Milieu M17** : ce milieu convient pour l'isolement des coques lactiques (Zadi-Karam et Karam, 2005).
- **Milieu MRS** : utilisé pour l'isolement des lactobacilles (Zadi-Karam et Karam, 2005).

I-2-2- Milieux d'enrichissement :

- **Bouillon Elliker** : utilisé pour l'enrichissement des Lactobacilles et des coques lactiques (Mechai, 2009).

I-2-3- Milieux d'identification :

- **Milieu gélosé de mannitol mobilité** : pour tester la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries isolées (12).
- **Bouillon nitraté** : pour la recherche de l'enzyme nitrate-réductase (12).
- **Milieu TSI** : pour l'étude de la fermentation des sucres (lactose, saccharose, glucose) (12).
- **Milieu Mevag** : pour l'étude de la fermentation des sucres additionnés (arabinose, maltose, galactose) (Carbonnelle *et al.*, 1987).
- **Milieu BCPL** : pour le test de l'homo-hétérofermentation (Guiraud et Galzey, 1980).
- **Bouillon hypersalé** : pour tester l'aptitude des bactéries à se développer en présence du chlorure de sodium (NaCl) (Mechai, 2009).
- **Clarck et Lubs** : pour l'étude de l'activité aromatisante (12).
- **Lait écrémé stérile** : pour l'étude du pouvoir acidifiant (Branger *et al.*, 2007).
- **Milieu gélose au lait / Milieu M17-milk agar et MRS-milk agar** : pour l'étude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques (13), (Zadi-Karam *et al.*, 2004).

I-3- Méthodologie :

I-3-1- Isolement des bactéries lactiques :

A partir de chaque échantillon du lait, des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2}) ont été effectuées dans de l'eau distillée stérile. Ensuite, les milieux d'isolement solides, M17 et MRS, sont ensemencés par chacune de ces dilutions en plus de l'échantillon pur. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les coques lactiques sur milieu M17 et pendant 48 heures pour les lactobacilles sur milieu MRS.

A partir des colonies suspectes isolées sur boîtes de pétri présentant la morphologie, la coloration de Gram, les tests de catalase et d'oxydase identiques à celles des bactéries lactiques, un repiquage est effectué sur bouillon d'enrichissement (bouillon Elliker) puis incubé pendant 24 heures à 37 °C, un deuxième isolement est effectué à partir du bouillon Elliker sur milieux M17 et MRS. Après incubation à 37 °C et aux temps appropriés à chaque genre, plusieurs paramètres sont étudiés pour la caractérisation des bactéries isolées.

I-3-2- Identification des bactéries lactiques :

A- Caractères culturaux et morphologiques :

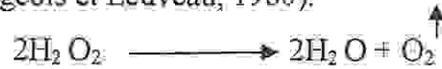
Une observation macroscopique de l'aspect des colonies est effectuée (couleur, taille, forme et contour...) dans le but de différencier les colonies suspectes.

Les cellules sont ensuite examinées au microscope optique pour différencier leur morphologie et leur disposition après coloration de Gram, technique très utile pour la classification des bactéries selon la composition de la paroi cellulaire et sa perméabilité.

B- Caractères biochimiques et physiologiques :

❖ Test de la catalase :

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène (Bourgeois et Leuveau, 1980).



La technique consiste à déposer une colonie de la culture à tester sur une goutte d'eau oxygénée. Si les bactéries examinées possèdent une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses (Hariri *et al.*, 2009).

❖ Recherche d'une cytochrome oxydase :

La cytochrome oxydase est le dernier transporteur d'électron de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transport d'hydrogène sur l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La technique consiste à utiliser des disques (OX) commercialisés par l'institut Pasteur, ces disques sont imprégnés de l'oxalate de diméthyle paraphénylène diamine, ce composé est oxydé par le système cytochrome C des bactéries dites oxydase positive en un composé violet. En pratique, le disque est imbibé avec une ou deux gouttes d'eau distillée stérile et une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine est alors étalée sur ce disque. La présence d'oxydase se manifeste alors par le développement d'une coloration violette (Mechai, 2009).

❖ Recherche d'une nitrate réductase :

Les bactéries possédant une nitrate-réductase peuvent réduire les nitrates en nitrites, d'autres peuvent les réduire jusqu'au stade azote gazeux, il s'agit de la nitrification.

La réduction des nitrates en nitrites est recherchée sur une culture en bouillon nitraté incubé à 37 °C pendant 24 heures, la mise en évidence de l'apparition des nitrites se fait par addition de quelques gouttes de chacun des deux réactifs : Nitrate réductase I et nitrate réductase II.

Si la réaction est négative, deux éventualités sont possibles ; ou bien la réduction a dépassé le stade nitrite et s'est poursuivie jusqu'au stade NH_3 ou N_2 ou bien les nitrates non réduits sont encore présents (bactérie nitrate-réductase négative). On ajoute à la culture un peu de poudre de Zn, on mélange et on laisse reposer. Si les nitrates n'ont pas été utilisés, ils seront réduits chimiquement par la poudre de Zn et la réaction colorée des nitrites apparait rouge. Par contre, si le milieu reste incolore les nitrates sont complètement réduits au-delà du stade nitrite et la présence de bulles gazeuses dans la culture témoigne de la réduction des nitrates en N_2 gazeux (Mechai, 2009).

❖ Etude de la mobilité et la dégradation du mannitol :

A partir des suspensions bactériennes, on ensemence par piqûre centrale le milieu gélosé semi-solide de mannitol mobilité puis on l'incube à 37°C pendant 24 heures.

Le virage de la couleur du milieu du rouge au jaune indique la dégradation du mannitol, les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la piqûre centrale (Guiraud et Galzey, 1980).

❖ Etude de la fermentation des sucres :

Ce test permet d'apprécier l'aptitude des bactéries à métaboliser divers sucres. A partir des suspensions bactériennes, on ensemence le milieu TSI en surface et par piqûre centrale puis on incubé à 37 °C pendant 24 heures. Le virage du culot du rouge au jaune indique la fermentation du glucose. Tandis que, le virage de la pente du rouge au jaune indique la fermentation du lactose et du saccharose (Denis et Ploy, 2007).

Une deuxième technique consiste à ensemencer par piqure centrale le milieu sucré gélosé semi-solide (Mevag). Ce dernier est incubé à 37 °C pendant 24-48 heures. Les sucres additionnés sont : galactose, arabinose, maltose. La fermentation du sucre additionné se traduit par un virage de la couleur du rouge au jaune (Carbonnelle *et al.*, 1987).

❖ Test de l'homo-hétérofermentation :

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme pour lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation du gaz (CO₂). A partir des suspensions bactériennes, on ensemence le milieu liquide (BCPL) contenant une cloche de Durham permettant la mise en évidence de la production du gaz. Puis on incube à 37 °C pendant 24-48 heures. Le test positif se traduit par un virage de l'indicateur coloré du violet au jaune, l'hétérofermentation est traduite par la production du gaz dans la cloche (Guiraud et Galzey, 1980).

❖ Croissance sur milieu hypersalé :

Ce test permet de voir l'aptitude des bactéries à se développer en présence de chlorure de sodium (NaCl). Cette aptitude est vérifiée par ensemencement du bouillon Elliker additionné respectivement de 2,5 %, 4 % et 6,5 % de NaCl. L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 48 heures. La présence d'un trouble indique la croissance bactérienne (Mechai, 2009).

❖ Température de croissance :

Ce test permet de différencier les bactéries mésophiles des bactéries thermophiles. Les tubes à essai contenant les milieux M17 et MRS sont ensemencés par les bactéries à tester. L'incubation est réalisée à des températures et des durées différentes : à 20 °C et à 45 °C pendant 24 à 48 heures (Hariri, 2009).

❖ Thermorésistance à 60 °C pendant 30 minutes :

Des tubes contenant le milieu Elliker sont ensemencés par les bactéries à tester, puis placés au bain marie à 60 °C pendant 30 minutes, refroidis et incubés à 37 °C pendant 48 heures (Houali, 1999).

I-3-3- Caractères industriels :

❖ Activité aromatisante :

La réaction de Voges-Proskauer est caractéristique de certaines bactéries. Elle consiste à révéler une étape intermédiaire de la transformation de l'acide pyruvique qui consiste en la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne). L'activité aromatisante est importante en industrie laitière car l'acétoïne est mise à profit pour donner de l'arôme aux produits laitiers.

La technique consiste à ensemencer les tubes de bouillon glucosé Clark et Lubs par les bactéries à tester qui seront par la suite incubées à 37 °C pendant 48 heures. Lors de la lecture des résultats, on ajoute aux tubes présentant un trouble 2 à 3 gouttes de réactif VPI (KOH) et VPII (naphтол). La réaction positive se traduit par une coloration rose à la surface du milieu après 5 à 10 minutes (Mechai, 2009).

❖ Pouvoir acidifiant :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée chez les bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Pour l'apprécier, les bactéries à tester sont inoculées dans des flacons contenant du lait écrémé stérile reconstitué à 10 % et incubés à 37 °C. Une fois le lait est coagulé, le pH est mesuré immédiatement (Branger *et al.*, 2007).

❖ Activité protéolytique :

Ce test a pour but la différenciation des bactéries protéase (+) et protéase (-). Pour cela, des disques de papier whatman stériles sont imbibés par les suspensions bactériennes à tester puis placés sur des boîtes de pétri contenant le milieu gélose au lait. Pour confirmer les résultats obtenus, le test est refait sur les milieux M17- milk agar et MRS-milk agar selon les bactéries isolées. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les bactéries protéase (+) apparaissent sous forme de larges colonies entourées par des zones blanchâtres dues à la croissance et à la dégradation de la caséine (13).

I-3-4- Extraction de l'ADN plasmidique :

La technique d'extraction utilisée est celle décrite par Birnboim et Dolys en 1979. Les étapes sont les suivantes :

- Obtenir une culture bactérienne par incubation de l'espèce donnatrice sur bouillon Elliker pendant une nuit à 37 °C sous agitation.
- Réaliser une centrifugation à 9000 tour/min pendant 4 min.
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 4ml de solution de lyse bactérienne et passer au vortex pour décoller le culot.
- Ajouter 8 ml de la solution de lyse alcaline au culot pour compléter la lyse cellulaire.
- Récupérer le surnageant après une deuxième centrifugation et précipiter avec de l'acétate de sodium et du méthanol pur et laisser 15 à 20 min au froid (-16 °C).
- Centrifuger et récupérer le culot et ajouter 500 µl d'éthanol et laisser au froid pendant quelques minutes.
- Réaliser une autre centrifugation et reprendre le culot dans le TE, puis conserver à 4 °C.

I-3-5- Electrophorèse de l'ADN plasmidique :

Elle est effectuée sur gel d'agarose à 1%, contenant du BET à 0,5mg/ml. La migration est réalisée dans une cuve sous un champ électrique de 69 V. La visualisation des bandes d'ADN plasmidique est faite sur une lampe à U.V ($\lambda = 254$ nm) et à l'obscurité.

I-3-6- Transformation bactérienne :

La technique utilisée est celle décrite par Birnboim et Doly en 1979. Les principales étapes sont les suivantes :

- Une culture de l'espèce réceptrice sur le bouillon d'enrichissement Elliker est obtenue par incubation à 37 °C pendant une nuit sous agitation.
- Relancer une culture au 1/20^{ème} à 37°C sous agitation pendant 2 heures pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.
- Centrifuger à 6000 t/min pendant 5min
- Reprendre le culot par 1ml de CaCl₂ (0,1M) froid.
- Réaliser une deuxième centrifugation, reprendre le culot dans du CaCl₂ et laisser le mélange 20 min à 4 °C.
- Refaire les deux dernières étapes.
- Mélanger 10 µl d'ADN et 20 µl des cellules compétentes.
- Incuber à 37 °C pendant 1min puis 1heure dans la glace.
- Ajouter 1 ml du bouillon frais et incuber sous agitation pendant 1 heure à 37 °C.

Après la transformation, on est passé à la vérification des caractères étudiés (les caractères d'identification : coloration de Gram, catalase, oxydase, nitrate réductase et mobilité et des caractères industriels : activités aromatisante, protéolytique et pouvoir acidifiant).

***RESULTATS ET
DISCUSSIONS***

Produced with Scantopdf

II- Résultats et discussions :

II-1-Résultats d'isolement :

Plusieurs tentatives d'isolement ont été effectuées à partir des différents échantillons de lait, cependant, certaines seulement ont été concluantes, les résultats d'isolement sont présentés dans le tableau VI.

II-1-1-A partir du lait cru :

Seule la boîte du milieu M17ensemencée par le lait de vache présente une poussée bactérienne. L'absence d'une poussée aux niveaux des autres boîtes ensemencées (lait de vache sur milieu MRS, lait de chèvre sur les milieux M17 et MRS) peut être due aux faibles taux des bactéries lactiques dans ces échantillons de lait, ceci est en effet lié à la différence entre la qualité du lait de vache et celle de chèvre, celle-ci est définie par son aptitude à favoriser la croissance des bactéries lactiques et est inhérente à plusieurs facteurs tel que l'alimentation (Morge *et al.*, 2004 ; Araba, 2006).

II-1-2-A partir du lait fermenté :

Sachant que le lait contient davantage des bactéries lactiques, on a jugé utile de le laisser fermenter afin de pouvoir réussir leur isolement. Cependant, on a remarqué une différence dans le temps de coagulation entre le lait de vache et de chèvre. Il était plus rapide (24 heures) pour le lait de vache par rapport à celui du chèvre (4 jours). Ceci peut être du à la diversité de la flore lactique du lait de vache. Les travaux de Karam *et al.*, (2003) ont montré que la fermentation rapide du lait de vache est liée à sa flore lactique.

Tableau VI : Résultats d'isolement des bactéries lactiques à partir du lait de vache et du lait de chèvre.

Milieu de culture	Echantillons	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
M17	Lait de vache cru	Petites colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème.	Cocci de couleur violette (Gram+) regroupés en amas, en chaînettes, en diplocoques et des monocoques.
	Lait de chèvre cru	/	/
	Lait de vache fermenté	Petites colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème.	Cocci de couleur violette (Gram+) regroupés en diplocoques, en amas et des monocoques.
	Lait de chèvre fermenté	Colonies moyennes, plates, arrondies, lisses à contour régulier, de couleur blanche laiteuse.	Cocci de couleur violette (Gram+) regroupés en courtes chaînes, en amas, en diplocoques et des monocoques.
	Lait de vache fermenté	Fines colonies transparentes, arrondies, lisses et bombées à contour régulier,	Cocci de couleur violette (Gram+) regroupés en amas, en diplocoques et des monocoques.
MRS	Lait de vache cru	/	/
	Lait de chèvre cru	/	/
	Lait de vache fermenté	Colonies de taille moyenne, lisses à contour régulier, de couleur blanche crème.	Bacilles de couleur violette (Gram+) regroupés en paire, en amas et des monobacilles.
	Lait de chèvre fermenté	/	/

L'examen microscopique après coloration de Gram nous a permis de différencier l'aspect morphologique des bactéries isolées ainsi que leurs arrangements. On a constaté une prédominance des coques lactiques dans les différents échantillons (Fig. 6, 7 et 8). Alors que les lactobacilles se révèlent uniquement dans le lait de vache fermenté (Fig. 9).

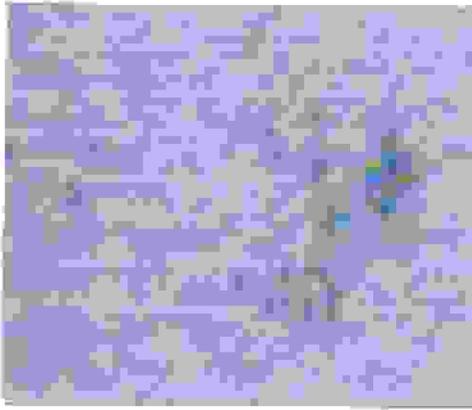


Figure 6: Coques lactiques isolées à partir du lait de vache cru sur milieu M17 (grossissement x100).

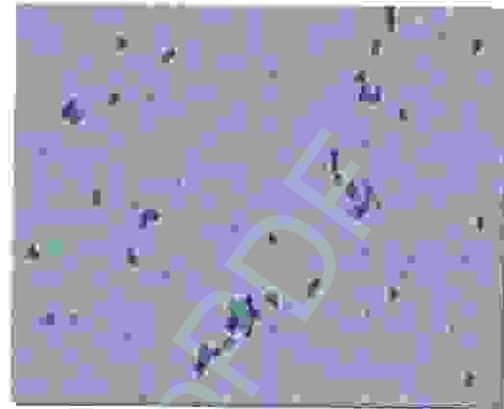


Figure 7: Coques lactiques isolés à partir du lait de vache fermenté sur milieu M17 (grossissement x100).

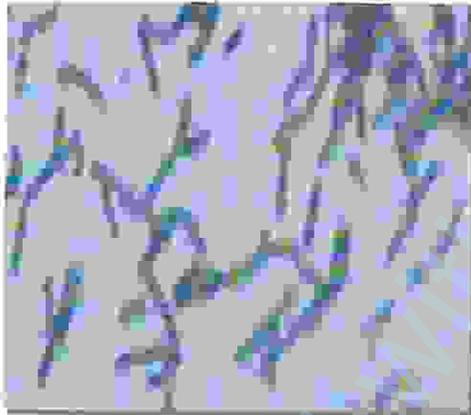


Figure 8: Streptocoques lactiques isolés à partir du lait de chèvre fermenté sur milieu M17 (grossissement x100).

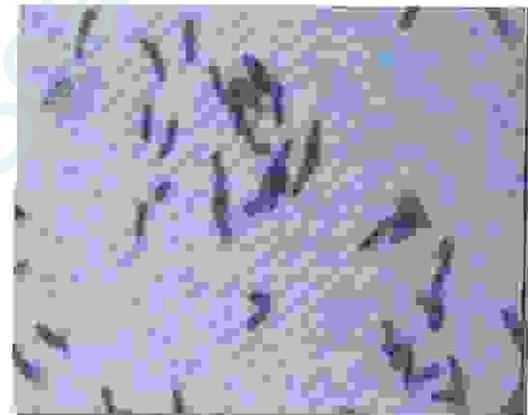


Figure 9: Lactobacilles isolés à partir du lait de vache fermenté sur milieu MRS (grossissement x100).

II-2- Résultats d'identification :

II-2-1- Résultats des tests biochimiques et physiologiques :

Les résultats des tests biochimiques et physiologiques obtenus sont regroupés dans le tableau VII. Ces résultats montrent clairement que les bactéries isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont : immobiles, Gram-positive, catalase-négative, oxydase-négative et généralement nitrate réductase négative. Ces résultats concordent avec les données de Leuveau et Bouix (1993).

Tableau VII : Résultats des tests d'identification des bactéries isolées.

Bactéries isolées Tests	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
Catalase	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	+	-	-	-	-
Mobilité	Immobiles (mannitol +)	Immobiles (mannitol+)	Immobiles (mannitol+)	Immobiles (mannitol+)	Immobiles (mannitol-)
Fermentation des sucres :					
-Glucose	-	-	+	+	+
-Lactose	+	+	+	+	+
-Saccharose	+	+	+	+	+
-Arabinose	-	-	+	-	-
-Galactose	-	-	+	-	-
-Maltose	-	-	+	-	-
Production d'hydrogène sulfureux	-	-	-	-	-
Type fermentaire	Homo (faiblement positif)	Homo	Hétéro	Hétéro.	Homo
Production d'acétoïne	-	-	+	-	-
Croissance sur bouillon hypersalé 2,5%	/	/	+	+	+
Croissance sur bouillon hypersalé 4%	/	/	+	+	-
Coissance sur bouillon hypersalé 6,5%	/	/	-	+	-
Croissance à 20°C	/	/	+	+	-
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+
Croissance à 45°C	/	/	-	-	+
Thermorésistance à 60 °C pd 30 min	/	/	-	-	+

Homo: bactérie homofermentaire, Hétéro: bactérie hétérofermentaire

B₁ : bactéries isolées à partir du lait de vache cru sur milieu M17.

B₂ : bactéries isolées à partir du lait de vache fermenté sur milieu M17.

B₃ : bactéries isolées à partir du lait de vache fermenté sur milieu M17.

B₄ : bactéries isolées à partir du lait de vache fermenté sur milieu MRS.

B₅ : bactéries isolées à partir du lait de chèvre fermenté sur milieu M17.

NB : Les boîtes contenant les bactéries B₁ et B₂ ont subi une contamination, c'est pour cette raison que le reste des tests n'a pas été effectué à partir de ces bactéries.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries B₃ apparaissent sous forme de colonies transparentes sur milieu M17, se caractérisent par un métabolisme hétérofermentaire (c'est-à-dire fermentent le lactose avec production de CO₂), elles fermentent également les sucres : glucose, galactose, arabinose, saccharose, mannitol et maltose, sont capables de croître aux températures 20°C et 37°C mais pas à 45°C, il s'agit donc de bactéries mésophiles, elles dégradent le citrate avec production d'acétoïne.

L'ensemble de ces caractéristiques et sur la base des données mentionnées par Guiraud (1998), Leuveau et Bouix (1993), il est permis dans ces conditions de suggérer qu'il s'agit de bactéries appartenant au genre *Leuconostoc*.

Les bactéries B₅ sont homofermentaires, leur activité fermentaire est réduite à quelques sucres qui sont le glucose, le lactose et le saccharose, capables de croître à 45°C mais pas à 20 °C et thermorésistantes à 60°C pendant 30 min, il s'agit donc de bactéries thermophiles, fortement sensibles au NaCl.

Ces caractéristiques nous orientent vers l'espèce *Streptococcus thermophilus* selon les données de Leuveau et Bouix (1993).

Les bactéries B₄ apparaissent sous forme de bacilles, elles possèdent un métabolisme hétérofermentaire et fermentent les sucres suivants : glucose, lactose, mannitol et saccharose, capables de croître aux températures 20°C et 37 °C mais pas à 45°C, il s'agit donc de bactéries mésophiles.

Ces caractéristiques rapprochent ces bactéries du genre *Lactobacillus*, (Leuveau et Bouix, 1993).

II-2-2- Résultats des caractères industriels :

A- Test de l'activité aromatisante :

Le test d'aromatisation montre que l'espèce *Leuconostoc sp.* produit de l'acétoïne, cette production est révélée par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu Clark et Lubs après addition de VPI et VPII (Fig.10). En revanche les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus sp.* ne produisent pas d'acétoïne. Ces résultats concordent avec les données de Bourgeois et Leveau (1980), Mechai (2009).



Figure 10 : Activité aromatique chez l'espèce *Leuconostoc sp.*

B- Test du pouvoir acidifiant :

Ce test montre que l'acidification révélée par la coagulation du lait par les espèces *Lactobacillus sp.* et *Streptococcus thermophilus* se manifeste dans les premières 18 heures d'incubation. Selon Leveau *et al.* (1991), cette coagulation est dite rapide. Cependant la coagulation du lait par l'espèce *Leuconostoc sp.* ne survient qu'après 42 heures, elle est donc dite lente. Les valeurs du pH mesurées juste après coagulation du lait sont représentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Valeurs du pH après coagulation du lait.

Bactérie testée	Valeur du Ph	Temps de coagulation
<i>Streptococcus thermophilus</i>	5,04	Avant 18 heures
<i>Lactobacillus sp.</i>	5,61	Avant 18 heures
<i>Leuconostoc sp.</i>	4,89	Après 42 heures

C- Test de l'activité protéolytique :

Le résultat de ce test se traduit chez l'espèce *Streptococcus thermophilus* par la croissance de colonies blanches entourées d'un halot blanc caractéristique de la précipitation de la caséine et donc de la présence de la protéinase (prot+). Ces résultats concordent avec les travaux de Shahbal Shahbal et Hemme (1991). Cependant, les espèces *Leuconostoc sp.* et *Lactobacillus sp.* sont caractérisées par un phénotype (prot-) car il y'a croissance de très petites colonies sans précipitation de la caséine même avec une prolongation de la durée d'incubation jusqu'à 72 heures (Fig. 11, 12, 13 et 14).

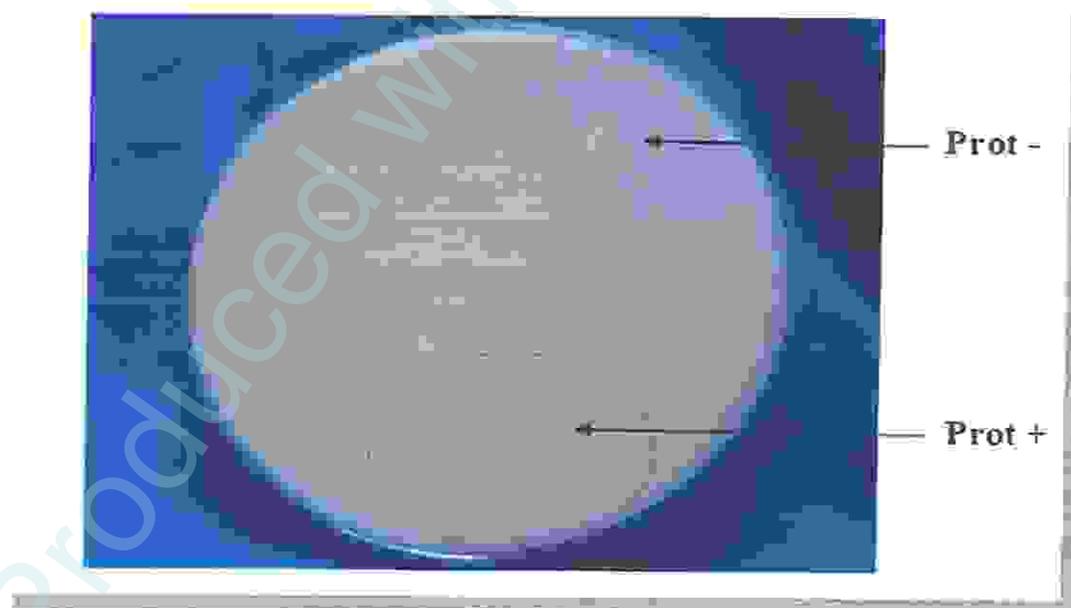


Figure 11 : Activité protéolytique des espèces *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc sp.* sur gélose au lait.



Figure 12 : Activité protéolytique des espèces *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc sp.* sur milieu M17 milk agar.



Figure 13 : Activité protéolytique de l'espèce *Lactobacillus sp.* sur gélose au lait.

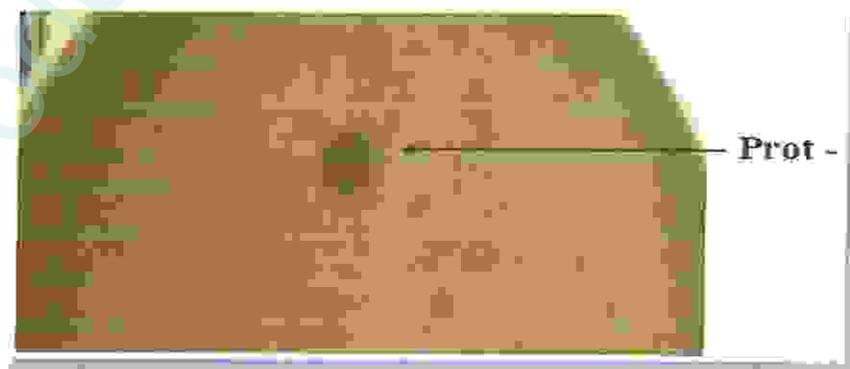


Figure 14 : Activité protéolytique de l'espèce *Lactobacillus sp.* sur MRS milk agar.

II-3- Résultat du profil plasmidique :

L'analyse électrophorétique sur gel d'agarose en présence de BET et sous la lumière ultraviolette a montré la présence d'une bande bien nette qui correspond à l'ADN plasmidique extrait à partir de l'espèce donnatrice (Fig. 15).

À partir de ce résultat, nous sommes en mesure de confirmer la présence de l'ADN plasmidique chez l'espèce *Streptococcus thermophilus*, mais la non disponibilité d'un témoin de taille nous a empêché d'estimer la taille de cette bande.



Figure 15 : Résultat du profil électrophorétique de l'ADN plasmidique de l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

II-4- Résultats de la transformation :

Rappelons que l'espèce *Leuconostoc sp.* a subi une transformation par le plasmide extrait à partir de l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Afin de connaître les nouveaux caractères acquis par l'espèce transformée, une étude comparative de quelques caractères des 3 espèces : transformante (*Streptococcus thermophilus*), transformée (*Leuconostoc sp.*) et non transformée (*Leuconostoc sp.* avant transformation) a été établie. Les résultats de ces caractères sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats des caractères étudiés chez les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc sp.* avant et après transformation.

Test	Espèce transformante	Espèce non transformée	Espèce transformée
Activité aromatisante	Acétoïne (-)	Acétoïne (+)	Acétoïne (+)
Pouvoir acidifiant	pH= 5,04 Coagulation avant 18 heures	pH= 4,89 Coagulation après 42 heures	pH= 4,94 Coagulation avant 18 heures
Activité protéolytique	Prot (+)	Prot (-)	Prot (+)

Les résultats de l'étude comparative montrent que l'espèce transformée *Leuconostoc sp.* reste acétoïne +, alors que pour le pouvoir acidifiant, on a constaté une réduction dans le temps de coagulation du lait chez cette espèce, il est devenu égal au temps de coagulation de l'espèce transformante *Streptococcus thermophilus*, c'est-à-dire que le lait coagule avant 18 heures d'incubation (coagulation rapide). De même pour l'activité protéolytique, on a constaté que l'espèce *Leuconostoc sp.* qui était à l'origine protéinase (-) est devenue protéinase (+) (Fig.16) après transformation par le plasmide extrait de *Streptococcus thermophilus*. D'après ces résultats, on peut dire que cette espèce a acquis deux nouveaux caractères à la fois (fermentation du lactose et activité protéolytique), ceci nous permis de déduire que ces deux caractères sont portés par le même plasmide. Ces résultats concordent avec les données de Desmazeaud (1983).

N.B : Il faut mentionner également que des tests de catalase, d'oxydase, de nitrate réductase, de mobilité et de métabolisme fermentaire ont également été effectués chez l'espèce transformée et les résultats répondent aux caractères biochimiques des bactéries lactiques.



Figure 16 : Résultat du test de l'activité protéolytique chez *Leuconostoc sp.* avant et après transformation sur gélose au lait.

CONCLUSION

Produced with ScanTopDF

Conclusion :

Dans ce travail, nous avons d'abord isolé des bactéries lactiques à partir de laits de vache et de chèvre prélevés des deux sites I.T.M.A et un propriétaire privé. Ces bactéries une fois isolées ont fait l'objet d'études pour bien les identifier et les caractériser.

Les tests d'identification effectués ont permis d'identifier à partir du lait de vache fermenté les espèces *Leuconostoc sp.* et *Lactobacillus sp.* et à partir du lait de chèvre fermenté l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Toutefois, on était limité à ce niveau d'identification en raison de l'absence de l'api 50 CH qui offre à la fois un gain de temps et une gamme de test assez large permettant ainsi une identification rigoureuse et plus poussée.

En ce qui concerne les résultats des caractères industriels, on a constaté une différence dans le temps de coagulation du lait entre ces trois espèces, contrairement à l'espèce *Leuconostoc sp.*, les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus sp.* ont un fort pouvoir acidifiant. L'activité protéolytique est observée uniquement chez l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Les résultats obtenus après transformation ont révélé que le pouvoir acidifiant ainsi que l'activité protéolytique sont portés par l'ADN plasmidique, car l'espèce *Leuconostoc sp.*, qui avait à l'origine un temps de coagulation du lait plus ou moins long et une activité protéolytique (prot-), est devenue après transformation, rapide dans le processus d'acidification du lait et protéinase (+).

Finalement, notre travail n'est qu'un essai à travers lequel on a voulu démontrer qu'avec le procédé de la transformation, il est possible de faire acquérir de nouveaux caractères à des bactéries lactiques et nous pensons avoir ouvert un chemin dans l'étude génétique des bactéries lactiques qui devrait permettre d'obtenir des souches plus résistantes aux phages, productrices de molécules nouvelles à intérêt médical ou bien modifiées dans leur métabolisme (production de métabolites...).

RESUME

Produced with ScantOPDF

Résumé :

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, elles sont très utiles à l'homme.

Ces bactéries produisent en effet une variété de composés, qui sont issus de leurs métabolismes glucidique et protéique et dont les plus importants sont : l'acide lactique, composés aromatiques...

Dans le présent travail, des bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de lait de vache et de chèvre ont été identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Des tests concernant la recherche de leurs caractères industriels (pouvoir acidifiant et activité protéolytique) ont été effectués et les résultats ont révélé une différence entre ces bactéries. Enfin une tentative de transformation génétique de l'espèce *Leuconostoc sp.* par le plasmide extrait à partir de l'espèce *Streptococcus thermophilus* est réalisée pour faire acquérir ces deux caractères étudiés.

Mots clés : bactéries lactiques, pouvoir acidifiant, activité protéolytique, transformation génétique, plasmide.

Produced with Scantopdf

Abstract:

Lactic Acid bacteria belongs to a group of beneficial bacterias wich are very useful to humain, these bacteria produce in fact, a variety of components wich are issued from their glucidic and proteic metabolism. The most important ones are: lactic acid and other aromatic components.

In the present investigation, isolated lactic acid bacteria from a sample of cows and goats milk are identified through the basis of a certain number of morphologic, physiologic and biochemical characteristics (aciditing and proteolic activity) were done and the results indicate a difference between these bacterias. Finally, there is a genetic attempt of transformation of *Leuconostoc sp.* through the plasmid extract by *streptococcus thermophilus* this is realised to acquire these two studied characteristics.

Key words: Lactic acid bacteria, acidity, proteolytic activity, genetic transformation, plasmid

Produced with Scantopdf

المخلص:

تتتمي البكتيريا اللبنية إلى مجموعة البكتيريا المفيدة، إنها مفيدة جدا للإنسان. هذه البكتيريا في الواقع تنتج مجموعة متنوعة من المركبات، والتي هي مستمدة من الكربوهيدرات والبروتينات وأهمها: حمض اللين و بعض المركبات العطرية...

في هذه الدراسة، تم عزل و تحديد مجموعة من البكتيريا اللبنية من عينات من حليب الأبقار والماعز على أساس عدد من الخصائص المورفولوجية، الفزيولوجية والبيوكيميائية. أظهرت نتائج البحث عن خصائصها الصناعية و المتمثلة في: عامل الحموضة والأبيض البروتيني وجود اختلاف بين هذه البكتيريا.

و أخيرا تم إجراء محاولة للتحويل الجيني للنوع *Leuconostoc sp.* وذلك باستخراج البلاسميد من نوع اخر من البكتيريا اللبنية *streptococcus thermophilus* بغرض الحصول على خصائصها الصناعية.

الكلمات المفتاح: البكتريا اللبنية، عامل الحموضة، الأيض البروتيني، التحويل الجيني، البلاسميد.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Produced with Scan PDF

Références bibliographiques

- Ayad H., Bellar N. (2002)
Synthèse sur la génétique moléculaire des bactéries lactiques, essai d'extraction d'ADN plasmidique et transformation des lactocoques, mémoire D.E.S à l'université Badji Mokhtar-Annaba, 59p.
- Araba A. (2006)
L'alimentation de la vache laitière, pour une meilleure qualité du lait, Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA, 142, 1-4.
- Birnboim H., Dolys S., (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic acids Res. 7, 1513-1523.
- Bourgeois C. M., Leveau J. Y. (1980)
Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, volume 3, Lavoisier, 331p.
- Bourgeois C. M., Larpent J. P., (1996)
Microbiologie alimentaire tome 2: Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier, 523p.
- Badis A., Laouabdia S., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrouf R. (2005)
Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et kabyle ». Sciences & Technologie, N°23, juin, pp. 30-37.
- Branger A., Richer M-M., Collectif. et Roustel S. (2007)
Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques, éditions : Educagri, 203 p.
- Boudjema, K. (2008)
Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister de l'université de M'Hamed Bougara – Boumerdès, 111p.
- Clows R., (1973)
Les molécules porteuses de la résistance aux antibiotiques in Hérité et manipulations génétiques, édition pour la science SARL, Paris, pp : 132 -142 dans Zadam et Tadjine, 1998).
- Carbonnelle B., Denis F., Mannonier A., Binon G. et Vargiver K. (1990)
Bactériologie médicale, Techniques visuelles. pp.23. dans (Ayad et Bellar, 2002).
- Charles B., Connor Bansh O., Tripathi R. (1991)

- Introduction à l'étude du lait, Série Technique de transformation du lait en milieu rural, 27p.
- Cuinin R. (1993)
Génétique bactérienne, édition : VIGOT, 206p.
- Corrieu G., Luquet F. (2008)
Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Lavoisier, 849p.
- Denis F., Ploy M-C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. (2007)
Bactériologie médicale : techniques usuelles, Masson, 573 p.
- Dortu C. et Thonart P. (2009)
Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**, 143-154.
- FAO, (1995)
Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Food et agriculture Org, 271p.
- Guiraud J., Galzy P. (1980)
Analyse micro-biologique dans les industries alimentaires, Lusine nouvelle, Paris. pp.236.
dans (Ayad, 2002)
- Guiraud J. (2003)
Microbiologie alimentaire, Dunod, 651p.
- Houali K. (1999)
Identification de bactéries lactiques isolées de lait cru (région d'Annaba), Etude de leurs aptitudes technologiques et de l'effet antagoniste des *Lactobacillus* sur *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Escherchia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus clavatus*, Thèse de doctorat de l'université Badji Mokhtar d'Annaba, 261p.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B. (2009)
Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube, *rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* p: 37-55.
- Joffin C., Joffin J. (1999)
Microbiologie alimentaire, 5^{ème} édition, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, 212p.
- Jorome J., Staley J., lory S. (2004)
Microbiologie, Dunod, 891p.
- Leuveau J.-Y., Bouix M. (1991)
Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires : le contrôle microbiologique, 2^{ème} édition, technique et documentation, pages : 125-183.
- Leuveau J.-Y., Bouix M. (1993)
Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier, 61 Ip.

Luquet F., Corrieu G. (2005), Lavoisier,
Bactéries lactiques et probiotiques, édition TEC et DOC, 307p.

Morge S., Laithier C., Mens P. (2004)
Guide d'appui technique pour l'accident de fromagerie à la ferme « défauts d'acidification »
,43p.

Madigan M., Martinko J. (2007)
Brock Biologie des micro-organismes, 11^e édition, Pearson Education France, 1047p.

Mechai A. (2009)
Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques
autochtones : études physiologiques et biochimiques, Thèse de doctorat de l'université Badji
Mokhtar, Annaba, 160p.

Orlino J. (1919)
The lactic acid bacteria in classification and physiology in lactic acid bacteria, (Teuber M.)
dans (Ayad, 2002).

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Bacq-Calberg C.-M. et Dusart J. (2003)
Microbiologie, 2^{ème} édition de Boeck, 1164p.

Penaud S. (2006)
Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *L.delbrueckii ssp.*
bulgaricus ATCC118402. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique de Paris-
Grignon, 267p.

Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N. (2009)
Protéolyse et Autolyse Chez Deux Lactobacilles Isolés de Lait Camelin du Sud Ouest
Algérien. European Journal of Scientific Research, ISSN 1450-216X Vol.34 N°2, pp.218-227.

Seppo S., Atte von w. et Ouwehand A. (2004)
Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 3^{ème} édition, marcel Dekkar, Inc,
633p.

Teuber M. (1992)
Lactic acid bacteria
Munich, Switzerland. pp. 325-344. Dans (Ayad, 2002)

Zadam A., Tadjine F. (1998)
Essai d'extraction d'ADN plasmidique et transformation des bactéries lactiques, mémoire de
fin d'étude de l'université Badji Mokhtar-Annaba, 30.

Zadi-Karam H., Kacem M. et Karam N.E. (2003) Lait de chamelle : Acidification et Effet de
la flore endogène ou de bactéries lactiques exogènes sur le contenu protéique, Renc. Rech.

Ruminants, N°10, Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie, page : 232.

Zadi-Kram H., Hassane O. et Karam E. (2004)

Pouvoir acidifiant et activité protéolytique des souches de *Lactococcus lactis* isolées de lait de chamelles de Timimoun (Sud algérien), Renc. Rech. Ruminants, N°11, Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, Oran, Algérie, page : 108.

Produced with ScanTOPDF

Webographie

- (1)- http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/LSTOCK/004/X6551F/X6551F02.htm
Ramet J.P. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen
DC : 27/04/2010.
- (2)- <http://agora.qc.ca/mot.nsf/Dossiers/Lait?OpenDocument&Click=>
Anonyme. Lait. MJ : 05/25/2006.
- (3)- <http://www.scribd.com/doc/24059964/Lait-0001>
Anonyme. Séparation des principaux constituants du lait. DC : 15/04/2010.
- (4)-
[http://www.idfdairynutrition.org/Content/Default.asp?PageID=547&languageCode=](http://www.idfdairynutrition.org/Content/Default.asp?PageID=547&languageCode=FR)
FR. Morris et Chapman. Glossaire. DC : 28/05/2010.
- (5)-
<http://lait.dairyjournal.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/pdf/2001/01/L1101.pdf>
Tailliez P. Les bactéries lactiques. DC: 15/02/2010
- (6)- <http://www.skytopic.com/59099803798-les-bacteries-lactiques>
Anonyme. Les bactéries lactiques. MJ : 15/12/2009.
- (7)- <http://www.agrojob.com/dictionnaire/definition-bacteries-lactiques-2407.html>
Anonyme. Définition bactéries lactiques. DC : 15/03/2010.
- (8)-http://www.produitslaitiers.com/fileadmin/PDF/Produitslaitiers/QS_30_bacteries_lactiques.pdf
Anonyme. Questions sur les bactéries lactiques. DC : 20/04/2010.
- (9)- <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.html>
Anonyme. Génétique bactérienne. DC : 13/05/2010.
- (10)- <http://www.bacteriologie.net/generale/transformation.html>
Anonyme. Transformation bactérienne. DC : 15/05/2010.
- (11)- <http://www.microbe-edu.org/etudiant/gene2.html>
Anonyme. Cours de Bactériologie Générale. DC : 10/05/2010.
- (12)- <http://microbiologie.110mb.com/>
Anonyme. Galerie biochimique. DC : 13/03/2010.
- (13)- <http://pagesperso-orange.fr/romain.ferry/micro/matmicro/micmil/milglait/gellait.htm>
Anonyme. Les milieux d'identification : Métabolisme protidique. MJ : 23/06/2005.

ANNEXES

Produced with ScantOPDF

Annexes I

Matériel utilisé

1- Verrerie :

- Tube à essai ;
- Bêchers ;
- Éprouvettes ;
- Pipettes graduées ;
- Pipettes Pasteur ;
- Flacons ;
- Lames ;

2- Appareillage :

- Etuve ;
- Bain marie agitateur ;
- Autoclave ;
- Réfrigérateur ;
- Congélateur ;
- Vortex ;
- Balance ;
- Centrifugeuse réfrigérée ;
- Agitateur et barreau magnétique ;
- Cuve d'électrophorèse ;
- Microscope optique (objectif à immersion).

3- Autre matériel :

- Bec bunsen ;
- Anse de platine ;
- Boîte de pétri ;
- Ependorffs ;
- Portoirs ;
- Micropipettes et cônes ;
- Papier Wattman ;
- Lampe à UV ;

Annexe II

Milieu Elliker (Elliker, Anderson et Hannesson, 1956) :**Composition :**

Tryptone	20g
Extrait de levure déshydraté	5g
Gélatine	2.5g
Lactose	5g
Saccharose	5g
Glucose	5g
Acétate de sodium trihydraté ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	2.5g
Chlorure de sodium (NaCl)	4 μ
Acide ascorbique	0,5g
Eau distillée	1000ml

Préparation :

Dissoudre les composants dans de l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, ajuster le pH à l'aide d'un pH mètre de sorte que le pH soit de 6.4, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

Milieu du lait écrémé reconstitué à 10% :**Composition :**

Lait en poudre	10g
Eau distillée stérile	100 ml

Préparation :

Mélanger les composants, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

Milieu Mevag :**Composition :**

Macération de viande (500g/l)	50ml
KCL	5g
Agar	3
Rouge de phénol (solution aqueuse à 2%)	10 ml
Eau distillée	1000 ml
Sucre utilisé	1 %

Préparation :

Mélanger les composants, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

Milieu gélosé au lait :**Composition :**

Peptone tryptique	5g
Agar	10g
Laït en poudre	10g
Eau distillée	1000ml

Préparation :

Mélanger les composants, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

M17 milk agar :**Composition :**

M17	175ml
Laït en poudre	5g

Préparation :

Mélanger les composants, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

MRS milk agar :**Composition :**

MRS	175ml
Lait en poudre	5g

Préparation :

Mélanger les composants, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

Solution de lyse cellulaire :**Composition :**

Tris	10mM
EDTA	50mM
Sucrose	8%
Triton X100	0,5%
Eau distillée	100ml

Solution de conservation :**Composition :**

Tris	10mM
EDTA	1Mm
Eau distillée	50ml

Solution de lyse alcaline :**Composition :**

SDS (dodécyl sulfate de sodium)	1 %
NaOH	0,2N
Eau distillée	20ml

Solution de précipitation :**Composition :**

Acétate de sodium	2,5M
Eau distillée	50ml