

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Activité protéolytique des bactéries lactiques isolées de
lait de chamelle.**

Présenté par:

BEN FAROUDJ Samia

BEN MOUIZA Fatma Zahra

BEN MOUIZA Maroi

Devant le jury composé de :

Président: BOUSSOUSSA Hadjer

MCA

Université de Laghouat

Examineur: KRANTAR Kamel

MAA

Université de Laghouat

Rapporteur : BOUNOUALA Fatima Zohra

MAB

Université de Laghouat

Année Universitaire : 2020/2021

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

A celle par qui je dois commencer pour lui dire que c'est grâce à tous ses sacrifices et ses efforts ; ma mère «Fatima», celle qui ma donnée l'amour et l'espoir qui me sont très chers car témoigne de son soutien pendant toute ma vie. Aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude et profonde affection.

A mon père adoré « Ahmed », qui était toujours à mes côtés Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

A mes frères : Faisal, Ilyas.

A mes sœurs : Houda, Djana.

A mes meilleures amies : Ihssane, Aroua.

Ma grande famille, mes oncles, tantes, paternels et maternels, mes cousins et cousines .

A toutes mes amies

SAMIA

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

A mes parents, Mama et Papa Je vous remercie du fond du cœur pour tout le soutien, tout l'amour, tous les conseils et toute la patience dont vous avez fait preuve durant mes études. Je sais tout ce que je vous dois, je n'en serais pas arrivée là sans vous, vous m'avez donné la force de faire ce que je voulais de ma vie, et pour tout cela, je vous en serais éternellement reconnaissante.

A mes frères : Ahmed, Fares.

A mes sœurs : Asma, Fatna, Ikram.

A toutes mes amies

MAROI

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

A ma raison de vivre, mes chers parents que dieu les garde pour moi, votre éducation soutenue, cohérente et rigoureuse a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vous m'avez donné les moyens d'aller aussi loin. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je vous dédis cette thèse, qui n'aurait pas pu être achevée sans votre éternel soutien Ce travail est un faible témoignage de ma reconnaissance et de mon amour.

A mes frères : Mohamed, Cherif, Massaoud ,Bachir .

A ma sœur : Halima.

A toutes mes amies

FATMA ZAHRA

Remerciements

Nous remercions avant tout, le bon dieu de m'avoir guidé tout au long de ma vie. Nous voudrions remercier particulièrement notre prometteur **Mr. Bounouala Fatima zahra**, Pour toute son aide, son suivi et sa confiance.

Nous tenons à de remercier l'enseignant **Mr. Krantar**,
Et madame **Boussoussa**.

Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Abstract

Our study focused on isolating lactic acid bacteria strains from a sample of camel milk collected in the region of Laghouat .

The different strains were identified on the basis of classical methods. The lactic acid bacteria strains were isolated following Gram stain and catalase assay, purified and then subjected to a set of biochemical and physiological tests. The results of the study showed strains of *Lactococcus*, and the identification of all isolates allowed them to be associated with one genre: *Lactococcus*.

We have demonstrated the proteolytic activity of the strains which have shown the ability to produce proteases in the growth medium when it is added with milk (MRS-milk agar, Agar-milk).

Key words: Camel milk, lactic acid bacteria, proteolytic activity, proteases, bioactive peptides.

المخلص

.ركزت دراستنا على عزل وتحديد بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من عينة من الحليب التي تم جمعها في منطقة الأغواط

تم تحديد السلالات المختلفة على أساس الطرق الكلاسيكية. تم عزل سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك حسب اختبار صبغة جرام والكاتلاز وتنقيتها ثم اخضاعها لمجموعة من الاختبارات البيوكيميائية والفسيزيولوجية. أظهرت نتائج هذه الدراسة *Lactococcus*: وجود سلالات من المكورات اللبنية وقد سمح التعرف على جميع العزلات بربطها بجنس واحد

لقد أظهرنا الطبيعة المحللة للبروتين للسلالات التي أظهرت القدرة على إنتاج البروتيناز في وسط النمو عند إضافة الأخير (، أجار الحليب MRS-أجار الحليب) مع الحليب

الكلمات المفتاحية: حليب الإبل ، بكتيريا حمض اللبن ، النشاط المحلل للبروتين ، البروتيناز ، البيبتيدات النشطة حيويًا.

Résumé

Notre étude a porté sur l'isolement et l'identification de bactéries lactiques, isolée à partir d'un échantillon de lait cru collecté dans la région de Laghouat.

Les différentes souches ont été identifiées sur la base des méthodes classiques. Les souches de bactéries lactiques ont été isolées suivant la coloration de Gram et le test de la catalase, purifiées puis soumises à un ensemble de tests biochimiques et physiologiques. Les résultats de cette étude montrent une présence des souches de lactocoques. L'identification de l'ensemble des isolats a permis de les rattacher en un seul genre : *Lactococcus*.

Nous avons mis en évidence le caractère protéolytique des souches qui ont montré l'aptitude à produire des protéases dans le milieu de croissance lorsque celui-ci est additionné de lait (gélose MRS-lait, Agar-lait).

Mots clés : Lait de chamelle, bactéries lactiques, activité protéolytique, protéases, peptides bioactifs.

Tables des matières

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	1
1. Synthèse bibliographique	
1.1. Lait de chamelle.....	3
1.1.1. Généralités sur le lait de chamelle.....	3
1.1.2. Caractéristiques physicochimiques du lait de chamelle.....	3
1.1.3. Caractères nutritionnelle et thérapeutiques du lait de chamelle.....	4
1.1.4. Microbiologie du lait de chamelle.....	5
1.2. Généralités Les bactéries lactiques.	5
1.3. Habitat.	7
1.4. Classification des bactéries lactiques.....	7
1.5. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques.....	9
1.6. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques..	11
1.6.1. Exigences en acides aminés.....	11
1.6.2. Exigences en vitamines	11
1.6.3. Exigences en bases azotées.....	12
1.6.4. Exigences en glucides.....	12
1.6.5. Exigences en sels minéraux.....	12
1.7. La protéolyse chez les bactéries lactiques.....	13
1.7.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques ans le lait.....	13
1.7.2. Le système protéolytique des bactéries lactiques.....	14
1.7.2.1. Les protéases de paroi	14
1.7.2.1.1. Classification des protéases de paroi	15
1.7.2.1.2. Intérêt technologique des protéases de paroi.....	16
1.7.2.2. Les protéases intracellulaires.....	16
1.7.2.3. Les systèmes de transport des acides aminés et des peptides..	16
1.7.2.4. Les peptidases.....	17

1.7.2.4.1. Classification et propriétés des peptidases.....	17
1.7.2.4.2. Intérêt technologique des peptidases.....	18
1.8. Intérêt de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.....	18
1.9. Peptides générés par la protéolyse et leurs activités biologiques.....	19
2. Matériels et Méthodes.....	20
2.2. Cadre de l'étude.....	21
2.2. Echantillon du lait cru.....	21
2.3. Milieux de culture.....	21
2.4. Isolement des bactéries lactiques.....	21
2.4.1. Préparation des dilutions.....	21
2.4.2. Isolement sur milieu MRS et M17.....	22
2.5. Purification des souches isolées.....	22
2.6.1. Conservation de courte durée.....	22
2.6.2. Conservation de longue durée.....	23
2.7. Identification phénotypiques des bactéries lactiques.....	23
2.7.1. Recherche des caractères macroscopiques.....	23
2.7.2. Recherche des caractères microscopiques.....	23
2.7.3. Test de catalase.....	23
2.7.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches.....	24
2.7.4.1. Etude du type fermentaire.....	24
2.7.4.2. Etude du profil fermentaire.....	24
2.7.4.3. La thermorésistance.....	25
2.7.4.4. Croissance à différentes températures.....	25
2.7.4.5. Culture sur milieu hypersalé.....	25
2.8. Recherche de l'aptitude protéolytique des souches.....	25
3. Résultats et discussion.....	26
4. Conclusion et perspectives.....	32
5. Références bibliographiques	33
Annexe.....	42

Liste des abréviations

- % : pour cent.
- °C : Degrés Celsius .
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ARNr 16S : Acide Ribonucléique 16 Svedberg.
- ATP : adénosine triphosphate.
- Ala : alanine.
- Asp : aspartate.
- BL : Bactérie Lactique.
- ECA : enzyme de conversion de l'angiotensin.
- Gln : glutamine.
- Glu : glutamate.
- Gly : glycine.
- GRAS : Generallyrecognized as safe.
- LAB : Lacticacidbacteria.
- Lb : Lactobacillus.
- Leu : leucine.
- Lys : lysine.
- MRS : Man Rogosa Sharp.
- NaCl : Chlorure de sodium.
- pH : potentiel d'hydrogène.
- Ser : serine.
- Thr : thréonine.
- Val : valine.

Liste des figures

Figure 01 : Voies majeures de fermentation chez les bactéries lactiques.....	7
Figure 02 : Schéma représentant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris Des genres apparentés	9
Figure 03 : Représentation schématique du système protéolytique chez <i>Lactococcus lactis</i> .	14
Figure 04 : Protéases de paroi de quelques souches de bactéries lactique	15
Figure 05: Les classes des peptides bioactifs.....	19
Figure 06 : préparation des déluions décimales à partir de lait de chamelle.....	22
Figure 07 : Aspect des colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS.....	26
Figure 08 : Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (GX100)... ..	27
Figure 09 : Croissance des souches à différentes températures.....	28
Figure 10 : Activité protéolytique des cellules entières sur milieu MRS-lait 5%.....	29
Figure 11 : Activité protéolytique des cellules entières sur milieu agar-lait 5%	30

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques physicochimique de lait camelin.....	3
Tableau 02 : peptidase des bactéries lactiques	18

Introduction

Le lait de chamelle présente sans aucun doute un intérêt particulier pour les nomades et les populations du sud, car il est parfaitement conforme aux exigences de l'homme vu sa haute teneur en nutriments de base (protéines, lipides, lactose), en vitamine C et en niacine. Son système protecteur naturel puissant (lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine, immunoglobulines et protéose-peptones) le distingue du lait bovin. Le lait de chamelle peut être consommé cru, pasteurisé ou fermenté.

C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Des travaux de certains auteurs ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Les bactéries lactiques possèdent des activités métaboliques diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leurs nombreuses applications à l'échelle industrielle particulièrement l'industrie laitière. Ainsi, la sélection des nouveaux ferments à partir de souches indigènes est un enjeu important ; Qui est basée sur leurs propriétés fonctionnelles et technologiques telles que l'activité protéolytique.

La protéolyse est un processus complexe qui permet la dégradation des caséines (protéine majoritaire du lait) en acides aminés nécessaires à la croissance des cellules bactériennes (nutrition azotée) et aussi en acides aminés précurseurs dans la synthèse des arômes. Ainsi l'utilisation de ces bactéries lactiques dans les technologies de transformation nécessite une bonne maîtrise afin d'obtenir un produit de qualité optimale et régulière.

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont également mis l'accent sur la libération des peptides biologiquement actifs à partir de protéines alimentaires en vue de les utiliser comme ingrédients alimentaires fonctionnels et bénéfique pour la santé. Ces peptides sont libérés par l'action d'enzymes qui hydrolysent les protéines sans dégrader les acides aminés. Contrairement à la synthèse chimique des peptides ou la protéolyse chimique des protéines, la protéolyse enzymatique est économique et hautement spécifique. La production des peptides d'intérêt technologique et biologique est dépendante de la nature du substrat (protéines) et de la spécificité des protéases utilisées.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de l'activité protéolytique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle collecté dans la zone de Laghouat.

Nous avons commencé par un isolement des souches bactéries lactiques à partir d'un échantillon de lait cru de chamelle, puis une caractérisation phénotypique des souches, et enfin la recherche de leur aptitude protéolytique dans différents milieux solides et leur capacité à sécréter des protéases dans le milieu extérieur.

1. Synthèse bibliographique

1.1. Lait de chamelle

1.1.1. Généralités sur le lait de chamelle

Le lait est défini comme produit de sécrétions des glandes mammaires, des mammifères comme la vache et la brebis, destinés à l'alimentation de jeune animal naissant. Le lait de chamelle est un liquide d'une couleur blanche mate, en raison de la structure et de la composition de sa matière grasse, pauvre en β -carotène. Il a un goût sucré ou salé, selon le type de fourrage ingéré et la disponibilité en eau, l'ingestion de fourrages comme la luzerne, lui donne un goût sucré, alors que l'ingestion de certaines plantes halophytes comme Atriplex, Salosa et Acacia rend salé (Naceur, 2017).

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle

Le lait de chamelle est de couleur blanche mate, avec goût un peu salé et un aspect plus visqueux que le lait de vache, qui est de couleur jaunâtre. Ces caractéristiques et surtout le goût du lait de chamelle diffèrent selon l'alimentation des animaux et la disponibilité en eau. L'ingestion de fourrages comme la luzerne, donne un goût sucré au lait, tandis que l'alimentation à base de plantes halophytes le rend salé. Les conditions environnementales ainsi que la période de lactation peuvent aussi déterminer la composition du lait de chamelle (Sboui *et al.*, 2009 ; Jilo et Tegegne, 2016). Comparé au lait bovin, le lait camelin se caractérise par une acidité plus élevée et une densité faible (Tableau 01).

La composition minérale du lait de chamelle diffère peu de celle du lait de vache, beaucoup de résultats ont montré qu'il y a toutefois un peu moins de sodium, calcium et phosphore, et plus de chlore et potassium dans le lait de chamelle. Par contre le lait de vache est plus riche en matière protéique, matière sèche et azote non protéique NPN (Kamoun, 1995).

Tableau 01 : Caractéristiques physicochimique de lait camelin (MENAD, 2017).

	pH à 20°C	Acidité (D°C)	Densité
Lait de chamelle	6.51 ± 0,12	18,6 ± 2,93	1,0230 ± 0,004

1.1.3. Caractères nutritionnelles et thérapeutiques du lait de chamelle

1.1.3.1. Caractères nutritionnelle

Le lait de chamelle présente des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base. Ce lait présente des taux de protéines variant de 2,5 à 4,5%. Les teneurs en matière grasse dans ce lait sont estimés en moyenne à 3,15%. La matière grasse cameline est caractérisée par la richesse en acide gras mono-insaturé à longue chaîne (acide stéarique et oléique). Le lactose constitue le sucre principal dans le lait. Sa concentration dans le lait camelin varie de 2,8 à 5,8%. Par ailleurs, les grandes concentrations en vitamine et en minéraux font de ce lait un véritable aliment à finalité diététique. À ce propos le lait de chamelle présente de faibles teneurs en vitamine A et B2 par rapport au lait de vache et de fortes teneurs en vitamine E et B1 dans le colostrum tandis qu'il présente un apport important en vitamine C (Siboukeur, 2012).

1.1.3.2. Caractères thérapeutiques

Des plusieurs études ont été effectués sur l'effet thérapeutique de lait de la chamelle parmi lesquelles :

- **Contre le diabète**

Selon Agrawal et ses collaborateurs (2003), Sur un échantillon aléatoire de 24 diabétiques atteint du diabète de type I (insulinodépendants), par ailleurs sans troubles cliniques associés. Ils ont traité, 12 d'entre eux avec du lait de chamelle avec une consommation d'un demi-litre par jour pendant 3 mois. Tous les patients étaient tenus de respecter le même régime et d'avoir une activité physique comparable entre les deux groupes ainsi qu'un traitement insulinique comparable. Après 3 mois de traitement, les patients buvant du lait de chamelle ont vu une amélioration de leur glycémie moyenne à jeun passant de 115 à 100 mg/100ml.

- **La lactoferrine contre le cancer (*in-vitro*)**

La lactoferrine est une protéine classique de tous les laits, connue pour ses propriétés antibactériennes, d'après (Habib *et al.* 2013), évalué le potentiel de la lactoferrine cameline à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du colon. Les essais *in-vitro* ont porté sur des lignées cellulaires HCT-116, et les mesures ont porté sur les dommages concernant l'ADN et

les activités anti-oxydantes. Les résultats montrent que la lactoferrine caméline a un effet inhibiteur avéré sur les cellules cancéreuses.

- **L'effet du lait de chamelle sur les fonctions hépatiques et rénales**

Selon Hamad et ses collaborateurs (2011), comparant lait de vache, lait de buffle et lait de chamelle, sur des rats (une trentaine) divisés en 5 groupes : un groupe restait témoin, étaient rendus diabétiques par l'injection de streptozotocin. Un des groupes diabétiques était également un témoin « diabétique » alors que les 3 autres ont reçu respectivement du lait de vache, du lait de buffle et du lait de chamelle pendant 6 semaines. Premier constat semble, la quantité d'insuline dans le lait de chamelle serait 3 fois plus importante (58,7 UI/l) que dans les laits de buffle (17,0 UI/l) et de vache (16,2 UI/l). Le lait de chamelle avait un effet hypoglycémiant nettement plus fort (de 49,2% par rapport au témoin diabétique) que les autres (11,1% pour le buffle et 11,6% pour la vache).

Au niveau du foie, une meilleure activité enzymatique avec le lait de chamelle (meilleure activité), et au niveau des fonctions rénales, une diminution significative de l'acide uréique, de l'urée et de la créatinine dans le sang, plus importante avec le lait de chamelle qu'avec le lait des autres espèces. Les auteurs en concluent un effet marqué du lait de chamelle sur les fonctions hépatiques et rénales des rats diabétiques.

1.1.4. Microbiologie du lait de chamelle

La qualité d'un aliment n'est pas uniquement définie par les différentes teneurs en nutriments qu'il contient, ni par sa composition en matières premières ou sa digestibilité et son appétence, ni même par son apparence ou ses caractéristiques sensorielles, mais aussi et surtout par son état hygiénique (**Gafner, 2012**).

Le lait est un substrat renfermant des concentrations satisfaisantes en protéines, en glucides, en lipides, en sels minéraux et en vitamines nécessaires à la croissance cellulaire. Les microorganismes existant dans notre environnement, vont donc trouver dans ce bioproduit un substrat idéal pour leur développement. La présence de nombreux facteurs de croissance permet de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans un milieu moins complet (**Larpent et al., 1997**).

1.2. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes caractérisé par la production de l'acide lactique comme produit final à partir de la

fermentation des carbohydrates. Elles sont, généralement, non pathogènes et considérées comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (**Mozzi et al., 2010**).

Les bactéries lactiques sont des bacilles ou des coques à Gram positif, immobiles, non sporulées, aéro- anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts et catalase négatif (**Sttanni et Moschetti, 2010**).

Elles produisent de l'acide lactique et éventuellement d'autres produits de fermentation. L'acidité produite permet la conservation de l'aliment en inhibant la culture de très nombreuses bactéries (**Guetarni, 2013**). Elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment ni l'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol. (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004**).

Selon le métabolisme glucidique, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

- *Homofermentaires* : (*Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus* et quelques espèces de *Lactobacillus*), elles produisent de l'acide lactique à partir de glucose via la voie d'Embden-Meyerhof. Dans les conditions défavorables de croissance (ex : limitation de glucose), ces bactéries peuvent produire, en plus du lactate, de formate, d'acétate, d'éthanol, et/ou de CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (**Figure 01**) (**Mozzi et al., 2010**).
- *Hétérofermentaires*: (*Leuconostoc, Weissella, Oenococcus* et un sous-groupe de *Lactobacillus*) (**Salminen et al., 2004**). Ces bactéries ne possèdent pas l'aldolase et la triose phosphate isomérase de la glycolyse. Le glucose est dégradé en acide lactique, CO₂, éthanol ou acide acétique via la voie de 6-phosphogluconate/phosphocétolase (**Mozzi et al., 2010; König et Fröhlich, 2009**).

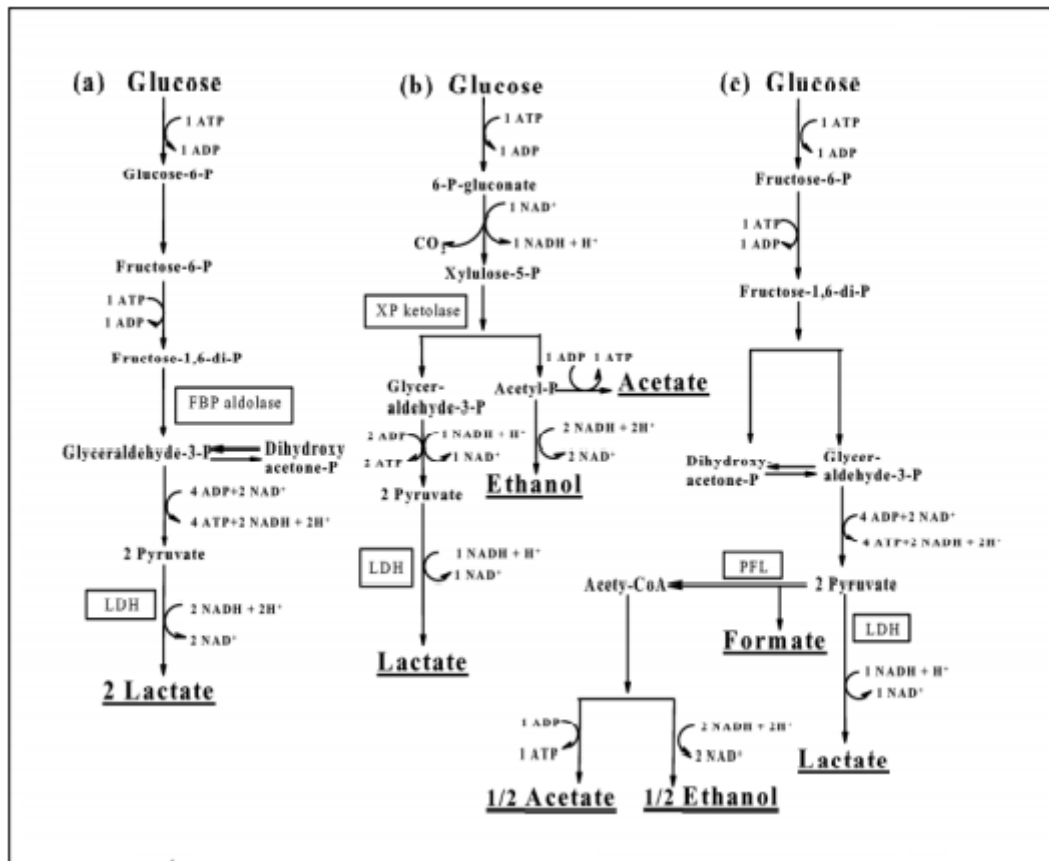


Figure 01 : Voies majeures de fermentation chez les bactéries lactiques (Martensson, 2002).

(a) Homofermentation, (b) : Hétérofermentation, (c) : Fermentation des acides mixtes

P : Phosphate, BP : Biphosphate. Les enzymes clés : FBP : Fructose 1,6-biphosphate, XP : Xylulose 5-phosphate, PFL : Pyruvate formate lyase, LDH : Lactate déshydrogénase.

1.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (plantes et fruits) (König et Fröhlich, 2009). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassen et Frank, 2001).

1.4. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène et ceci non seulement de coté métabolique mais aussi de coté morphologique, d'habitat, cette propriété d'hétérogénéité

confère à ce genre des bactéries une diversité permettant de dresser une taxonomie (**Hansal, 2015**).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6,5%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone,... etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (**König et Fröhlich, 2009**).

Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes (**McLeod et al., 2008**).

Le groupe I renferme majoritairement les Lactobacilles homofermentaires. Le groupe II contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier qui occupe une position intermédiaire entre les groupes I et II, renferment ainsi des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (**McLeod et al., 2008**).

Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei*- *Pediococcus* (**Rodrigues et al., 1991 ; Vandamme et al., 1996**).

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (**Figure 02**).

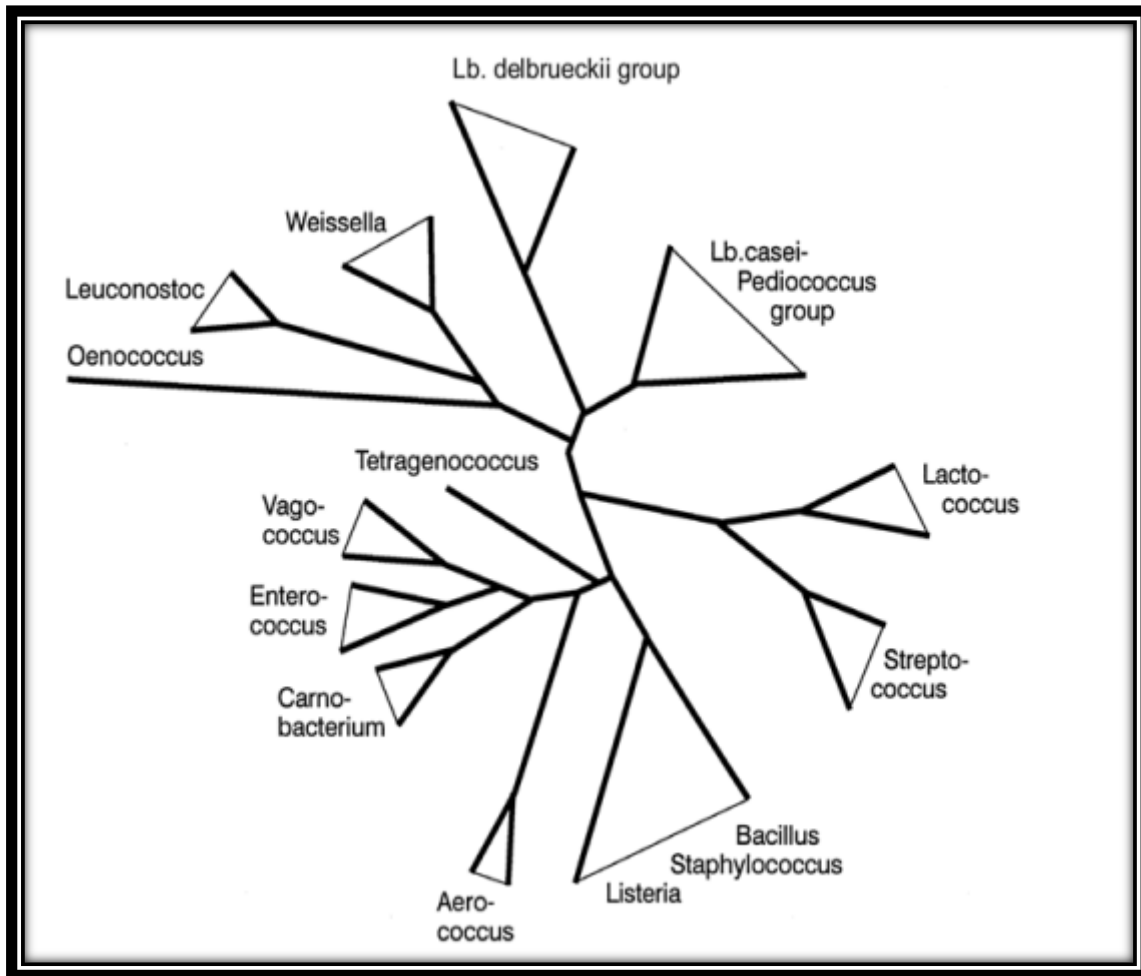


Figure 02 : Schéma représentant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparentés (Axelsson, 2004).

1.5. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques

L'utilisation des LAB pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

- **Activité acidifiante**

L'activité acidifiante est une activité métabolique essentielle chez les bactéries lactiques. Elle résulte de la transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acides organiques, ce qui conduit à l'acidification du produit. Elle conditionne pour une grande part l'aptitude du lait à la coagulation comme elle assure l'inhibition des microorganismes indésirables (Montel *et al.*, 2005; Corrieu et Luquet, 2008).

La majorité des bactéries utilisées dans les produits laitiers ont un métabolisme homofermentaire car elles produisent presque exclusivement de l'acide lactique à partir des

sucres; soit quatre moles d'acide lactique formé à partir d'une mole de lactose consommé. Cependant, les LAB thermophiles sont souvent incapables de métaboliser le galactose issu de la scission du lactose. Dans ce cas seules deux moles d'acide lactique sont produites (**Corrieu et Luquet, 2008**).

- ***Activité aromatisante***

Les bactéries lactiques peuvent produire de nombreux composés aromatiques, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (**Corrieu et Luquet, 2008**). Ainsi, les acides lactique et acétique produits par *Lc. lactissubsp. lactis* et *Lc. lactissubsp. cremoris* confèrent au laits fermentés une arôme caractéristique; celle des fromages maturés est associée à plusieurs métabolites tels que: l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et le 2-3-butylène-glycol à partir du citrate par *Lc. lactissubsp. lactis var. diacetylactis* et *Leuconostoc spp.* (**Salminen et al., 2004**).

- ***Activité gazogène***

Les ferments contenant des LAB hétérofermentaires (principalement du genre *Leuconostoc*) ou capables de métaboliser le citrate (*Leuconostoc* ou souches de *Lc. lactissubsp. lactis var. diacetylactis*) produisent des quantités significatives de CO₂. Cette production favorise la formation des ouvertures dans certains types de fromages comme elle peut conduire à des défauts dans d'autres types (**Corrieu et Luquet, 2008**).

- ***Propriétés enzymatiques***

La nutrition azotée dans le lait constitue l'un des principaux facteurs limitant la croissance des LAB auxotrophes pour un nombre variable d'acides aminés. Certaines espèces possèdent un système protéolytique leur permettant d'utiliser les acides aminés issus de la dégradation des protéines et des peptides. Cette activité participe au développement de la texture et de la saveur dans les produits laitiers. L'activité lipolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (**Corrieu et Luquet, 2008; Mozzi et al., 2010**).

- ***Propriétés texturantes***

Plusieurs souches de LAB sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS) c'est-à-dire des polysaccharides à l'extérieur de la paroi cellulaire qui sont, soit attachés à cette paroi sous forme de capsule, soit excrétés dans l'environnement extracellulaire sous forme de gomme (**Salminen et al., 2004; Devoyod et Poullain, 1988**). Cette propriété est

utilisée principalement pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés.

Ainsi, la production d'exopolysaccharides par les LAB, lors de leur développement dans le lait évite l'augmentation du taux protéique du produit ou d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que des texturants et des épaississants, lors de la production de yaourt (**Corrieu et Luquet, 2008**).

1.6. Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont un besoin pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre des éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, par ce qu'elles ont une faible biosynthèse donc ce sont auxotrophes. Alors elles sont considérées comme un groupe de bactéries le plus exigeant de point de vue nutritionnel (**Dridier et Prevost, 2009**).

1.6.1. Exigences en acides aminés

Les bactéries lactiques exigent l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (**Desmazeaud, 1983**). Elles ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, ou des peptides courts. Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des protéines du lait notamment les caséines, par les protéases situées dans la paroi extérieure de la cellule (**Desmazeaud, 1998**).

Les lactobacilles ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (**Lenoir et al., 1992**), alors que les lactocoques exigent pour leur croissance seulement deux acides aminés, l'isoleucine et la leucine (**Juillard et al., 1996**).

1.6.2. Exigences en vitamines

Les vitamines jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire, les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser des vitamines (**Desmazeaud et De Roissart, 1994**). La vitamine B6 (pyridoxal) est stimulante ; l'acide aminé L-alanine peut remplacer cette dernière chez certaines souches. En général, l'acide folique ou folinique, la thiamine et la vitamine B12 ne sont pas exigés. Il existe une distinction claire entre *St. lactis* et *St. cremoris*, cette dernière espèce exigeant la riboflavine. Les exigences en biotine ont été plus difficiles à mettre en évidence car des interférences avec l'utilisation du CO₂ peuvent se produire. En effet, le CO₂ serait essentiel pour la croissance des streptocoques lactiques car il serait

impliqué dans la biosynthèse de l'acide aspartique et des acides gras par un phénomène de fixation faisant intervenir la biotine (**Law et Sharpe, 1978**). Les streptocoques thermophiles montrent une exigence absolue en acide pantothénique et en riboflavine et à un moindre degré en thiamine, en nicotinamide (ou acide nicotinique) et en biotine. La pyridoxine (ou ses dérivés) stimule fortement leur croissance (**Guss et Delwiche, 1954**).

1.6.3. Exigences en bases azotées

Chez certaines souches de lactocoques, la production d'acide dans le lait peut être stimulée par le mélange adénine, guanine, uracile et xanthine (**Selby-Smith et al., 1975**).

Les streptocoques thermophiles présentent une exigence absolue pour ces quatre bases. Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile (**Ramasamy et Natarajan, 1981**). D'autre part, l'acide orotique, qui est un intermédiaire de la synthèse des bases puriques, est un facteur de croissance pour *Lb bulgaricus*. L'acide orotique régule la synthèse des acides ribonucléiques, tandis que la synthèse des acides désoxyribonucléiques n'est pas affectée. En général, chez les lactobacilles, les exigences en bases azotées sont très variables selon les souches ; l'addition de ces composés peut même, chez certaines souches, entraîner des phénomènes d'inhibition de la croissance (**Desmazeaud, 1992**).

1.6.4. Exigences en glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes. Premièrement, le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire. Deuxièmement, le catabolisme intracellulaire du sucre et enfin la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides (**Desmazeaud, 1983**).

1.6.5. Exigences en sels minéraux

Le magnésium et le manganèse sont généralement requis, ils jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (**Ledesma et al., 1977 ; Mazali, 1992**), alors que les besoins en calcium et en potassium sont moins systématiques. Les besoins en fer dépendent des micro-organismes (**Pandey et al., 1994; Imbert et Blandeau, 1998**). Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à fort

concentration. A l'opposé, le sodium, le cadmium, et le cuivre démontrent un effet inhibiteur (Corrieu et al., 2008).

1.7. La protéolyse chez les bactéries lactiques

La protéolyse chez les bactéries lactiques est assez bien documentée. La machinerie protéolytique développée chez ces bactéries est assez complexe du fait de la présence limitée d'acides aminés dans le milieu lait et des auxotrophies de ces bactéries pour plusieurs acides aminés. Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait (Poolman et al., 1995 ; Kunji et al., 1998 ; Savijoki et al., 2006).

La protéolyse chez les bactéries lactiques commence par l'action d'une protéase de paroi, enzyme à sérine qui hydrolyse la caséine du lait en oligopeptides. Certaines souches de bactéries lactique ne possèdent pas de protéase de paroi et dépendent de la protéase de paroi présente chez les autres souches pour se développer dans le lait (Savijoki et al., 2006).

1.7.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques dans le lait

Dans le lait les bactéries lactiques utilisent en premier lieu les acides aminés libres, mais leur teneur est très faible (de l'ordre de 85 mg/l) (Mills et Thomas, 1981; Juillard et al., 1995). Cette concentration ne permet que 2% de la croissance totale, ce qui démontre que les acides aminés libres du lait ne jouent qu'un rôle mineur lors de la croissance des bactéries lactiques dans le lait. Ces bactéries, exigeantes d'un point de vue nutritionnel et auxotrophes pour certains acides aminés, doivent donc trouver une source d'azote complémentaire, elles utilisent alors les peptides et les caséines du lait. Cette utilisation requiert l'intervention de la protéase de paroi, qui libère un ensemble d'oligopeptides à partir des caséines qui pourront ensuite être transportés à l'intérieur de la cellule, via le système de transport des oligopeptides.

Les caséines du lait représentent la principale source d'azote pour les lactocoques: 90 % de la croissance leur est imputable (Monnet et al., 1993). Les caséines sont organisées en micelles, particules sphériques formées par l'association des caséines (α S1, α S2, β , κ), de quelques fragments peptidiques (caséine γ) et de composants minéraux, principalement du calcium et du phosphate. Elles contiennent de nombreux résidus proline qui empêchent la formation de l'hélice α et du feuillet β , permettant ainsi une structure moléculaire ouverte, sensible à l'action des protéases. Leur utilisation met en œuvre un système complexe, qui fait

intervenir plusieurs enzymes pour leur dégradation en acides aminés et en oligopeptide et leur transport à l'intérieur de la cellule microbienne (Kunji et al., 1996; Christensen et al., 1999).

1.7.2. Le système protéolytique des bactéries lactiques

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Kamaly et Marth, 1989). Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (Lane et Fox, 1996 ; Lynch et al, 1997).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure dans la formation de molécules aromatiques (alcools, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Figure 03) (Williams et al., 2001).

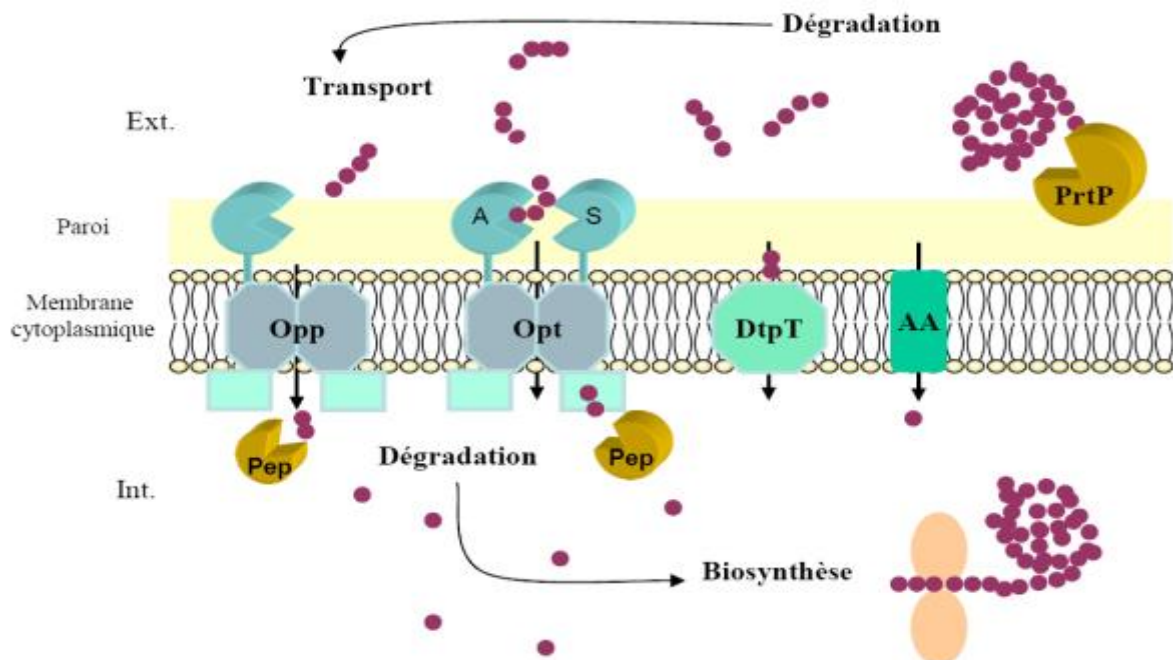


Figure 03: Représentation schématique du système protéolytique chez *Lactococcus lactis* (Savijoki et al., 2006; Doeven et al., 2005, Kunji et al., 1995).

1.7.2.1. Les protéases de paroi

Chez de nombreuses BL utilisées en industrie laitière, une protéase de paroi est retrouvée. Cette protéase permet à ces différentes espèces d'hydrolyser les lactoprotéines et de

se développer dans le lait. Certaines souches de BL ne possèdent pas de protéase de paroi et se développent mal ou dépendent de la protéase de paroi présente chez l'autre espèce qui se développe en symbiose dans le lait (Savijoki *et al.*, 2006).

Les protéases de paroi assurent la première étape dans la cascade des réactions permettant la dégradation des caséines du lait (Juillard *et al.*, 1996 ; Vinogradov *et al.*, 2013). Cinq types de protéase de paroi de la même famille mais présentant certaines différences ont été caractérisées chez les bactéries lactique : PrtP chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, PrtH chez *L. helveticus*, PrtR chez *Lactobacillus rhamnosus*, PrtS chez *S. thermophilus* et PrtB chez *L. bulgaricus* (Figure 04) (Savijoki *et al.*, 2006).

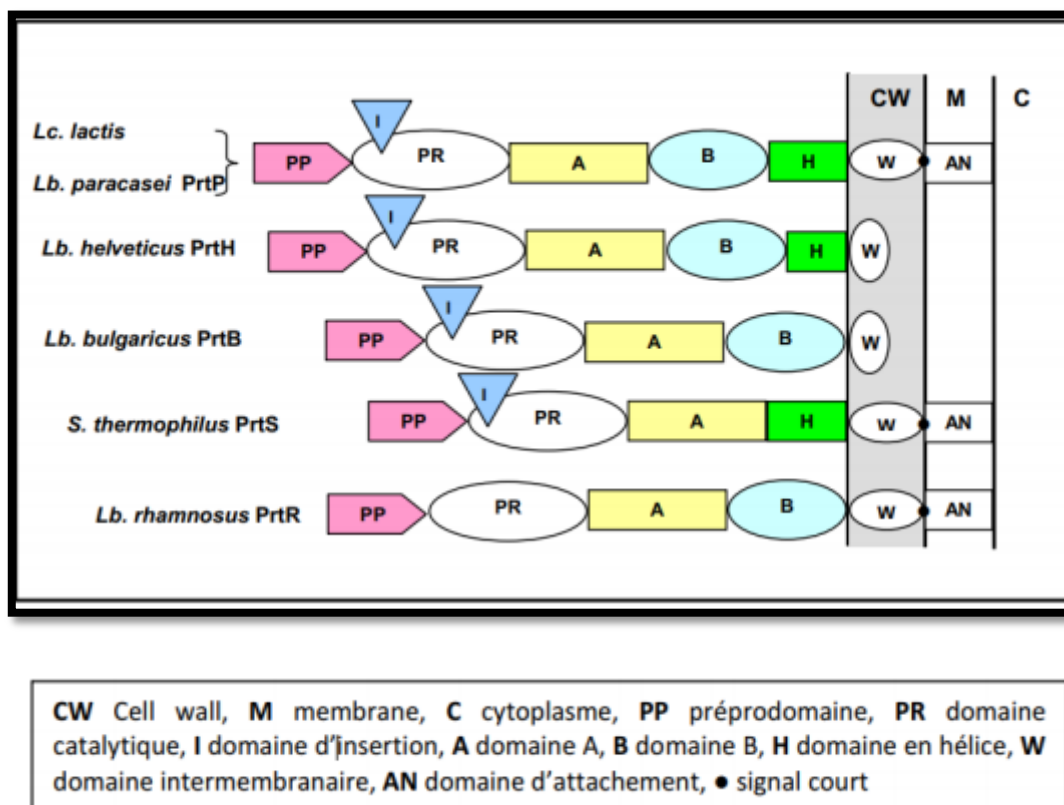


Figure 04: Protéases de paroi de quelques souches de bactéries lactique (Siezen, 1999).

1.7.2.1.1. Classification des protéases de paroi :

Deux classes de protéases de paroi ont été décrites chez les lactocoques selon leur spécificité pour le substrat : les protéases de type PI ayant une préférence pour la β caséine et les protéases de type PIII qui dégradent les 3 types de caséine : α caséine, β caséine et κ caséine (Kok, 1990 ; Reid *et al.* , 1995 ; Kunji *et al.* , 1996) .

Chez les lactobacilles, un troisième type de protéase de paroi a été décrit. Ce sont des protéases intermédiaires appartenant au type P1 tout en ayant une activité sur la caséine α SI (Juillard *et al.* , 1995 ; Kabadjova - Hristova *et al.* , 2006).

1.7.2.1.2. Intérêt technologique des protéases de paroi

Les protéases de paroi sont les enzymes clés du système protéolytique des bactéries lactiques et sont impliquées dans la première étape de la dégradation des caséines. En plus de leur rôle vital pour la croissance bactérienne, elles contribuent au développement de la flaveur et de la texture des produits fermentés. En outre, certaines protéases de paroi peuvent libérer, durant la fermentation laitière, des peptides à activités biologiques (Broadbent *et al.*, 2002).

1.7.2.2. Les protéases intracellulaires

Les bactéries lactiques possèdent également des protéases intracellulaires. Cependant leur rôle dans la maturation du fromage n'est pas précisément défini (Mc Sweeney, 2004). En plus de leur rôle strictement nutritionnel qui permet aux bactéries d'utiliser les peptides ayant franchi les enveloppes microbiennes, les enzymes protéolytiques intracellulaires interviennent dans la nutrition à trois niveaux : lors de l'hydrolyse de peptides éventuellement toxiques (résistance aux antibiotiques), dans le « turn - over » des protéines intracellulaires et dans la synthèse et la maturation des protéines intracellulaires (De Roissart et Luquet, 1994).

1.7.2.3. Les systèmes de transport des acides aminés et des peptides

- *Les systèmes de transport des peptides*

20% des peptides issus de l'hydrolyse des caséines sont ingérés par les bactéries lactiques via leurs systèmes de transport actifs (Kunji *et al.*, 1993; Tynkkynen *et al.*, 1993). C'est la deuxième étape de la caséinolyse. *Lactococcus lactis* possède trois systèmes de transport de peptides le système Opp impliqué seulement dans le transport des peptides issus de l'hydrolyse des caséines, le système DtpT qui est spécifique du transport des di- et tripeptides endogènes du lait et le système Opt capable de transporter les deux types de peptides

- *Système de transport des acides aminés*

Les lactocoques possèdent au moins dix systèmes de transport d'acides aminés qui se caractérisent par une haute spécificité pour la structure des acides aminés comme par exemple: Glu / Gln, Leu / Ile /Val, Ser / Thr, Ala/ Gly, Lys /Arg /Orn (Koningsetal., 1989).

1.7.2.4. Les peptidases

Les peptides issus de l'hydrolyse des caséines par les protéases de paroi sont dégradés grâce aux peptidases en acides aminés et oligopeptides capables d'être transportés à l'intérieur de la cellule via le système de transport membranaire actif (Monnet et al., 1993)

1.7.2.4.1. Classification et propriétés des peptidases :

Les peptidases des BL peuvent être classées selon la position de la liaison peptidique hydrolysée en endopeptidases ou exopeptidases.

Les exopeptidases hydrolysent la première liaison peptidique du côté amino-ou carboxy- terminale des peptides. Chez les bactéries lactiques seules les aminopeptidases ont été clairement identifiées et caractérisées. En fonction de leur spécificité, on distingue: des amino-, di- ou tripeptidases, ainsi que des peptidases spécifiques des peptides contenant de la proline . Ces enzymes sont toutes codées par des gènes chromosomiques (**Mierau et al., 1994; Hellendoorn et al., 1997; Matos et al., 1998**). Les dipeptidases ou tripeptidases sont des exopeptidases de type aminopeptidases .

Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de l'oligopeptide. Sur la base de leur spécificité, on distingue les endopeptidases spécifiques dont la spécificité du substrat est plus étroite (PepS ,PepL , PepG , PepW et PepT) voire spécifiques d'un acide aminé comme de la proline (PepX , PepI , PepQ et PepR) ou des acides aminés acides (PepA) (**Tableau 02**).

La grande majorité des peptidases identifiées sont de localisation intracellulaires (**Atlan et al., 1989 ; Kunji et al., 1996 ; Lanfermeijer et al., 1999, 2000**). Certaines peptidase hydrolysent spécifiquement certaines séquences, ainsi par exemple Pep X et Pep Q sont spécialisées dans l'hydrolyse des peptides contenant la proline, très abondantes dans les caséines (**Hassaine, 2013**).

D'autres peptidases ont plus de spécificité de substrat telles que : PepA qui libère les acides aminés acides à partir des peptides de trois à neuf résidus ; PepP, qui préfère les tripeptides contenant une proline au milieu ; PepR et PepI, qui agissent sur les dipeptides avec une proline en première position ; PepQ, qui dégrade les dipeptides à proline en deuxième position ; et PepS, qui montre une préférence pour les peptides contenant deux à cinq résidus avec une arginine ou des acides aminés aromatiques en position N-terminale (**Kunji et al., 1996 ; Christensen et al., 1999 ; Fernandez-Espla et Rul, 1999**).

En général, les aminopeptidases sont subdivisées en trois groupes selon la structure de leur site actif ou de leur mécanisme de catalyse : métallo-aminopeptidases, cystéine-aminopeptidases et sérine-aminopeptidases.

Tableau 02 : peptidase des bactéries lactiques (Hutkins, 2001).

Peptidase	Abréviation	Spécificité de substrat
Aminopeptidase A	PepA	Glu/Asp↓(X)n
Aminopeptidase C	PepC	X↓(X)n
Aminopeptidase L	PepL	Leu↓X ou Leu↓X-X
Aminopeptidase N	PepN	X↓(X)n
Aminopeptidase P	PepP	X↓Pro-(X)n
Aminopeptidase X	PepX	X-Pro↓(X)n
Pyrrolidone carboxyl peptidase	PCP	Glu↓(X)n
Dipeptidase V	PepV	X↓X
Dipeptidase D	PepD	X↓X
Tripeptidase T	PepT	X↓X-X
Proiminopeptidase	PepI	Pro↓X-(X)n
Prolidase	PepQ	X↓Pro
Prolinase	PepR	Pro↓X
Endopeptidase F	PepF	(X)n-X-X↓X-(X)n
Endopeptidase O	PepO	(X)n-X ↓ X-(X)n
Endopeptidase E	PepE	(X)n-X ↓ X-(X)n
Endopeptidase G	PepG	(X)n-X ↓ X-(X)n

1.7.2.4.2. Intérêt technologique des peptidases

Outre leur rôle dans la nutrition azotée, les peptidases des bactéries lactiques permettent l'hydrolyse des peptides amers dans les fromages et la libération d'acides aminés précurseurs de composés d'arômes (Monnet *et al.*, 1993; Jakob et Piccinali, 2006).

Les peptides PepN ,PepT et PepX ont été rapportées les plus importantes dans le processus de l'affinage. PepN intervient dans le développement de la saveur. Particulièrement dans la dimension de l'amertume (Guldfeldt *et al.*, 2001).

1.8. Intérêt de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est faible comparativement aux autres genres bactériens tels que Bacillus et Pseudomonas. Cependant, elles jouent un rôle capital : d'une part elles stimulent la croissance des bactéries lactiques en leur fournissant les acides aminés dont elles ont besoin et d'autre part, elles interviennent dans l'affinage du fromage, étape au cours de laquelle se développent les caractéristiques organoleptiques du produit. (Law et Kolstad, 1983 ; Gobbetti et Fox, 1996). Cette activité protéolytique intervient de ce

fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final.

1.9. Peptides générés par la protéolyse et leurs activités biologiques :

Les peptides présentent des compositions en acides aminés, des propriétés physicochimiques, des séquences ou des structures particulières qui permettent un éventail très large de fonctionnalités qui vont intéresser divers secteurs d'applications industrielles. La composition en acides aminés et la digestibilité de certains hydrolysats ou de fractions peptidiques vont conférer d'excellentes propriétés nutritionnelles avec des applications dans le secteur de l'alimentation, voire de la santé. Les propriétés physico-chimiques des peptides dues à la variété de fonctions chimiques des chaînes latérales exposées sont à l'origine des propriétés de texturation de produits agroalimentaires (propriétés dites fonctionnelles) ou cosmétiques. Enfin, les activités biologiques portées par de nombreux peptides permettent d'envisager des applications dans le secteur de la santé ou des nutraceutiques (**Kim et Mendis, 2006**).

Les peptides bioactifs sont des fragments de protéines pouvant être libérés par hydrolyse enzymatique lors de la digestion gastro-intestinale ou lors des traitements industriels. En général, les peptides bioactifs comptent 2 à 20 acides aminés. Ils peuvent exercer de nombreuses activités sur les systèmes immunitaire, cardio-vasculaire, gastro-intestinal et nerveux via différents modes d'action (**Figure 05**).

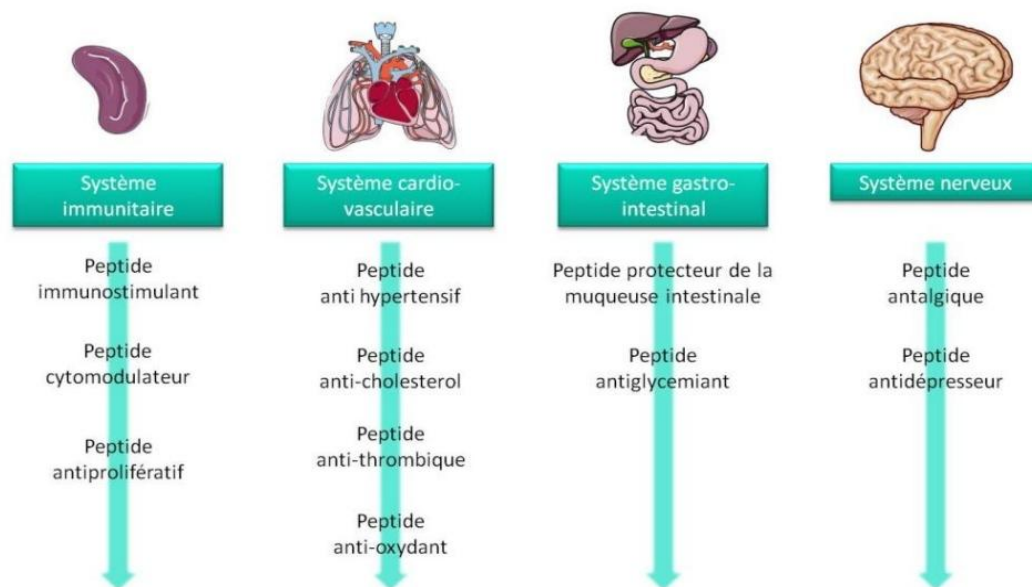


Figure 05 : Les classes des peptides bioactifs.

A ce jour, les protéines laitières constituent la source la mieux caractérisée (**Léonil et al., 2002**). Outre le développement de ces produits innovants, la présence naturelle de peptides bioactifs dans des produits laitiers traditionnels comme les fromages a été mise en évidence (**Saito et al., 2000 ; Rizzello et al., 2005**). De plus, ces fromages traditionnels (utilisation de lait cru) sont à l'origine d'une diversité des souches microbiennes, ceci a pour conséquence une plus grande diversité des enzymes protéolytiques d'origine microbienne qui contribue probablement à la plus grande diversité des peptides libérés. Des données convergentes indiquent que parmi les protéines laitières, les caséines constituent probablement la source potentielle la plus intéressante de peptides bioactifs (**Sofia et al., 2005**).

De nombreuses activités biologiques (antioxydante, anti-hypertensive, antibactérienne, antifongique, antithrombotique) ont été mises en évidence (**Kim et Mendis, 2006**).

2. Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie (Labo 07) du département de Biologie – Faculté des Sciences - l'université Amar Telidji -Laghouat.

2.2. Echantillon du lait cru

Un échantillon de lait cru de chamelle a été utilisé dans ce travail, Il a été collecté dans des flacons stériles pendant le mois de Mars 2021 dans la région de Laghouat puis transporté au laboratoire dans une glacière.

2.3. Milieux de culture

Les bactéries lactiques sont connues par leurs exigences nutritionnelles, et nécessitent pour leurs croissances des milieux nutritifs riches et complexes.

Pour une croissance optimale le milieu utilisé est: le milieu MRS (**Man, Rogosa et Sharpe., 1960**), pH 5,7.

Le milieu MRS est utilisé sous forme liquide ou solide additionnés d'agar agar à 1,5 %, et stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Pour l'étude du caractère protéolytique des souches, Le lait écrémé est stérilement ajouté au milieu de culture liquide ou solide (2%).

La composition des milieux de culture utilisés dans ce travail est donnée en annexe 1.

2.4. Isolement des bactéries lactiques

2.4.1. Préparation des dilutions

L'échantillon du lait cru a été tout d'abord mit à coaguler à 30°C pendant 24h. Cette incubation du lait favorise le développement de la flore lactique endogène mésophile. Après coagulation, les premières dilutions étaient préparées en mélangeant 1ml de lait avec 9ml d'eau physiologique. A partir de cette solution mère, des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été effectuées (**Figure 06**).

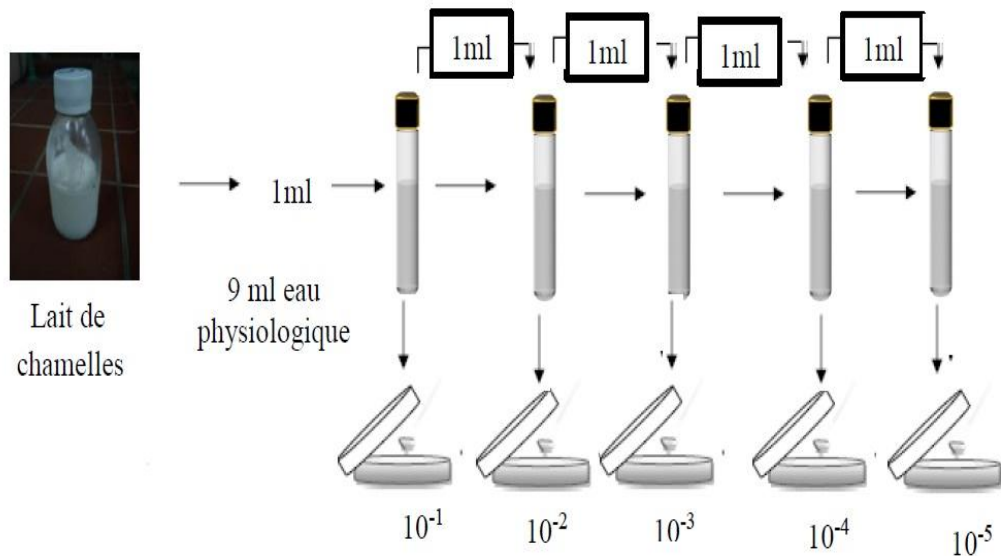


Figure 06 : préparation des dilutions décimales à partir de lait de chamelle.

2.4.2. Isolement sur milieu MRS

Les cultures étaient réalisées par étalement, à l'aide d'un râteau, de 0.1ml d'échantillon de chaque dilution sur milieu solide. L'incubation des cultures bactériennes en milieux MRS a été réalisée à l'étuve à 30°C sans agitation pendant 24 à 48 heures.

2.5. Purification des souches isolées

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS par la technique des quadrants. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 48h. La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant les mêmes caractères.

2.6. Conservation des souches

2.6.1. Conservation de courte durée

Les souches pures sont cultivées sur gélose MRS inclinée en tube pendant 48h à 30°C à l'étuve, leur conservation se fait à 4°C pour une durée de une à quelques semaines selon la souche. Des repiquages sont effectués périodiquement.

2.6.2. Conservation de longue durée

Les souches bactériennes sont conservées sur lait écrémé reconstitué à 10%. Le laitensemencé par une culture jeune (18h) et incubé à 30°C jusqu'à coagulation puis conservé à -20°C.

2.7. Identification phénotypiques des bactéries lactiques

Après purification des bactéries isolées, nous les avons identifiés par des méthodes d'identification classique basées sur l'étude des caractères phénotypiques.

2.7.1. Recherche des caractères macroscopiques

Les colonies obtenus après purification sont ensuite observés à l'œil nu afin de déterminer leurs caractères morphologiques : la forme du relief (bombée, semi-bombée, plate), la taille, la couleur, l'aspect (collant, filamenteux), la transparence (opaque, translucide), l'allure des contours (régulier, dentelés), la pigmentation, l'aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

2.7.2. Recherche des caractères microscopiques

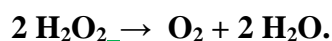
L'observation microscopique des bactéries isolées a été faite après coloration de Gram sur un frottis fixé à la chaleur d'un petit fragment d'une colonie de la bactérie étudiée.

Cette méthode de coloration permet de différencier les bactéries Gram+ qui apparaissent en violet à celles Gram- qui apparaissent en rose selon la composition de la paroi bactérienne.

L'observation microscopique se fait à l'objectif x100 avec de l'huile à immersion, à ce stade on peut observer la forme, le mode d'arrangement et le Gram des cellules bactériennes qui peuvent être colorées en violet (Gram+) ou en rose (Gram-).

2.7.3. Test de catalase

La catalase est une oxydoréductase hémique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène :



La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation par l'O₂ de l'air, des protons (et électron) issus des voies d'oxydation directes, elle est mise en évidence par contact des cellules avec une solution fraîche d'eau oxygénée 1/10. Une effervescence due à un dégagement de dioxygène signe la présence d'une catalase.

Les souches à Gram positif et catalase négatif sont retenue pour la suite de l'étude.

2.7.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches

2.7.4.1. Etude du type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). Des souches fraîches préalablement cultivées sur gélose MRS ont été ensemencées dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS sans citrate et une cloche de Durham. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24–48 heures.

Après incubation, le développement d'une souche homo-fermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz, par contre dans le cas d'un métabolisme hétéro-fermentaire, la croissance se manifeste par l'apparition d'un trouble avec production de gaz (CO₂) qui s'accumule dans les cloches de Durham.

2.7.4.2. Etude du profil fermentaire

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. et ceci constitue un critère indispensable d'identification (**Thompson et Gentry-Weeks,1994**). L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le bouillon MRS modifié (sans glucose et sans extrait de viande), de pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH, le glucose du milieu est remplacé par le sucre à tester à raison de 0,1 (g/l) (**Leveau et al., 1991**).

Les sucres testés sont : glucose, fructose, lactose, Maltose, saccharose. Les solutions sucres sont préparées à 3% puis stérilisées. Un millilitre de solution de sucre est additionné à 10 ml de MRSBCP. Après inoculation, le milieu est recouvert d'une couche fine d'huile de paraffine stérile pour créer une micro-anaérobiose. Après incubation à 30°C pendant 48 heures, la fermentation des sucres se traduit par le trouble du milieu accompagné par le virage de l'indicateur de pH du violet vers le jaune, ce qui est dû à la production d'acide. Dans le cas

d'absence de virage de couleur, on en déduit que le sucre testé n'est pas dégradé par la souche.

2.7.4.3. La thermorésistance

Le test de thermorésistance permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester ont été préalablement réparties dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS. Ces tubes ont été par la suite exposés à une température de 60°C pendant 30 min puis refroidis rapidement sous un jet d'eau de robinet, l'incubation a été faite à 30°C pendant 48 heures (**Guiraud et Galzy, 1980**). Les isolats qui ont poussé après ce traitement sont considéré comme thermorésistants.

2.7.4.4. Croissance à différentes températures

Ce test est important de point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermotolérantes. Les isolats ont été ensemencés dans le milieu MRS liquide, puis les tubes ont été incubés à différentes températures à 10°C, 40°C et 50°C pendant 24 heures à 48 heures. La croissance est révélée par apparition d'un trouble bactérien.

2.7.4.5. Culture sur milieu hypersalé

La croissance des souches à été testée à différents concentration de chlorure de soduim (NaCl). Ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl, en les incubant à 30° pendant 48 heures. Ce test permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*. La présence du trouble indique la croissance des bactéries lactique en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

2.8. Recherche de l'aptitude protéolytique des souches

L'aptitude à la protéolyse des cellules est mise en évidence sur milieu Agar –lait, le milieu est préparé en utilisant de l'eau distillée additionnée de 1,5% d'agar, après stérilisation le milieu est additionné de lait écrémé stérile à une concentration finale de 4%.

Le milieu est ensemencé à la surface par touches par une pré-culture fraîche (DO= 1). Après incubation à 30°C pendant 48h, l'activité protéolytique des cellules est révélée par l'apparition d'une clarification autour des touches, qui est évaluée par le rapport diamètre du halo (H) sur diamètre de la colonie(C): H/C.

3. Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Pré-Identification des isolats

Lors de cette étude nous avons purifiée les souches isolées à partir du lait cru de chamelle.

3.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures en milieu MRS solide a montré des colonies de couleur blanche, d'aspect crémeux, de surface lisse bombée et à contour régulier, de 2 à 3 mm de diamètre (figure3). Cet aspect correspond bien à ce qui est décrit dans la littérature pour les bactéries lactiques (**Figure 07**).

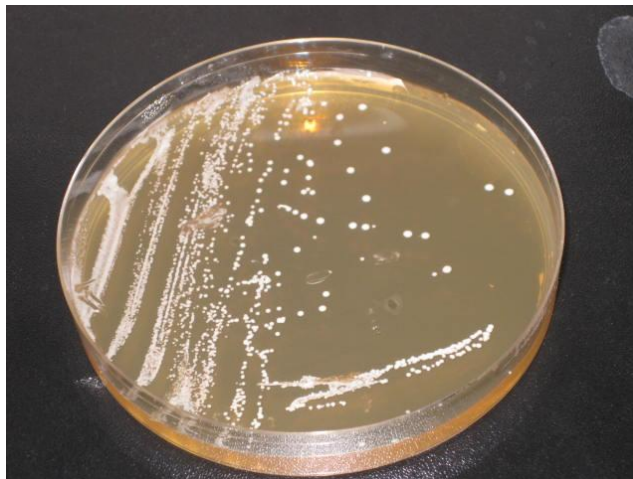


Figure 07: Aspect des colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS.

3.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique des frottis après coloration de Gram indique que toutes les souches sont à Gram positif, et se présentent sous forme de cocci (arrondies) associées en chainettes (**Figure 08**).

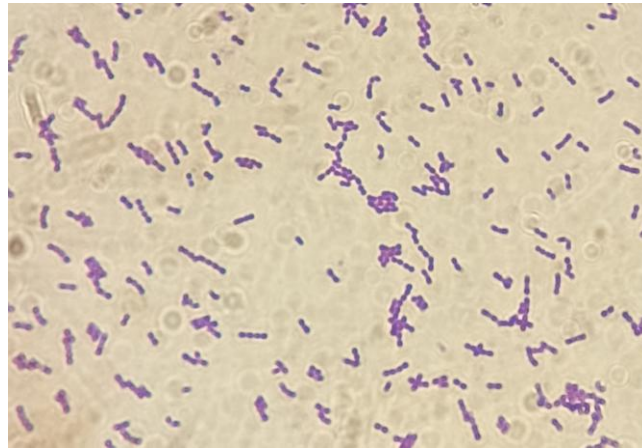


Figure 08 : Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (GX100).

3.2. Test de catalase

Le test de catalase est négatif pour toutes les souches et c'est ce qui confirme leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

3.3. Caractéristiques physiologiques et biochimiques

3.3.1. Type fermentaire

Le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz, par contre, dans le cas d'un métabolisme hétérofermentaire, la croissance se manifeste par l'apparition d'un trouble avec production de gaz recueilli dans la cloche de Durham (**Dicks et Van Vuvren, 1987 ; Axelsson, 2004**).

Après 48h d'incubation à l'étuve, nous avons constaté que les souches étudiées sont homo-fermentaires (pas de dégagement de CO₂ dans les cloches de Durham)

Les bactéries lactiques homo-fermentaires stricts ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate.

Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires tels que fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétéro-fermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase.

3.3.2. Profil fermentaire

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leurs capacités à fermenter les sucres en acide lactique et d'autres acides organiques.

Les bactéries lactiques possèdent la capacité de dégrader différentes sources de carbone, et ceci constitue un critère indispensable d'identification.

On a pu observer que toutes les souches étudiées consomment les sucres: glucose, fructose, lactose, Maltose, saccharose et les utilisent en tant que source de carbone.

3.3.3. La thermorésistance

Ce traitement de thermorésistance permet de sélectionner les lactocoques en éliminant les streptocoques et les entérocoques. Toutes les souches ne survivent pas après un traitement de thermorésistance (absence des troubles pour tous les isolats testés).

3.3.4. Croissance à différentes températures

La croissance est mise en évidence par la présence de troubles. Selon la température optimale de croissance, les bactéries sont classées en mésophiles dont la température est 30°C et les thermophiles avec une température optimale de croissance allant de 40°C (**Frank et al., 2002**).

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées poussent à 30°C, Cependant, aucune souche ne peut se croître à une température de 45 °C ou à 50°C (**Figure 09**).

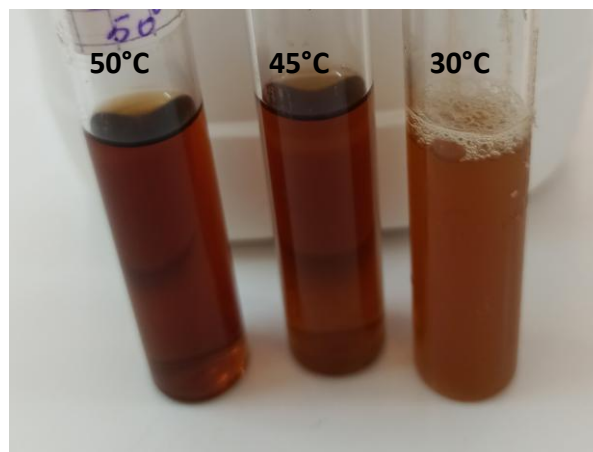


Figure 09 : Croissance des souches à différentes températures.

3.3.5. Croissance en milieu hypersalé

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées poussent à 4% de NaCl. Cependant, aucune souche n'a pu se croître 6,5% de NaCl.

3.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le caractère protéolytique des cellules est confirmé par l'apparition d'un halo clair correspondant à la dégradation des protéines du lait (caséines) autour des colonies ensemencées par touche sur milieu solide MRS additionné de 5% de lait écrémé ainsi que sur milieu agar-lait 5%.

Le résultat obtenu sur MRS lait montre que la souche isolée (H/C 2,33cm) possède une activité protéolytique plus importante (**Figure 10**), ces résultats rejoignent les résultats de **Bounouala (2019)** et **Messaoui (2013)**, qui a trouvé un rapport H/C de 1,5 cm pour une souche du genre *Lactococcus* (LCL).

Les mêmes résultats sont obtenus sur le milieu agar-lait 5%, le rapport H/C pour la souche est de 2 cm (**Figure 11**).

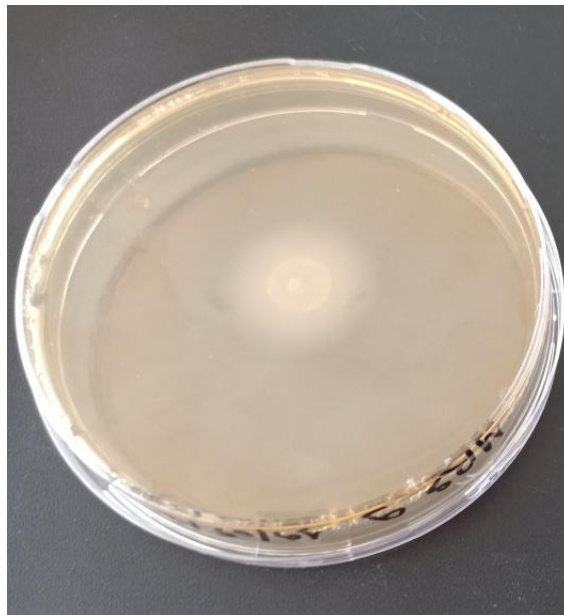


Figure 10 : Activité protéolytique des cellules entières sur milieu MRS-lait 5%.



Figure 11 : Activité protéolytique des cellules entières sur milieu agar-lait 5%.

La présence de substances tel que les peptones et les extraits de levure dans le milieu MRS apportent les acides aminés et les peptides nécessaires à la croissance optimale des bactéries lactiques, ces remarques pourraient expliquer en partie la différence entre les rapports H/C dans les milieux MRS-lait qui sont beaucoup plus important que ceux dans le milieu agar-lait, car les concentrations en acides aminés libres et peptide dans le lait sont trop faibles pour permettre aux bactéries lactiques de croître abondamment (**Auclair 1990 ; Juillard *et al.*, 1995**) ce qui les oblige à développer leurs systèmes protéolytiques ,et c'est ce qui permet de détecter la souche la plus protéolytique .

Marilley *et al.*, (2004), ont noté que les cellules entières de lactobacille sont plus protéolytiques que les cellules entières de lactocoque. Selon **Marie.A-C *et al.*, (2001)**, les lactobacilles montrent généralement une activité protéolytique plus importante que les lactocoques.

Discussion générale

A partir d'un seul échantillon de lait cru de chamelle provient de la région de Laghouat, nous avons isolé plusieurs souches de genre *lactococcus*, elles se sont révélées positives à la coloration de gram et catalase négative.

L'étude macroscopique réalisée sur milieu solide nous a permis d'observer de petites colonies blanchâtres, lisses et régulières. L'examen microscopique nous a permis de

sélectionner des bactéries qui présentent une forme sphérique, qui se colorent positivement à la coloration de gram, et qui sont immobiles.

Les souches isolées dans le présent travail sont de type homofermentaire (absence de dégagement de CO₂ dans la cloche de Durham). Ce résultat est de nature à indiquer que cette souche appartient au genre lactococcus (**Sebastien, 2008**).

Les souches isolées sont capables de croître à 10°C, 30°C et 40 °C et non pas à 50°C, elles peuvent pousser en présence de 4% de NaCl et non pas à 6,5%, elles ne survivent pas après leur exposition à 63,5°C pendant 30 min.

Selon les travaux de **DeRoissart (1986)** ; **Guirad (2003)** ; **Bekhouche et boulahrouf (2005)** ; les isolats qui ont une forme des coques associée en chaînette de longueur variable et qui sont homofermontaire, mésophile et ont une inhabilité de croître à pH 9,6 à 6,5% de NaCl et incapables de résister à 63°C pendant 30 minutes et qui possèdent de l'arginine et ne possèdent pas d'acétoïne et peuvent dégrader le glucose, le maltose, le raffinose, et le saccharose sont des lactococcus lactis et les même résultats ont été observé pendant notre étude ce qui indique les isolats sont caractérisés comme souches des *lactococcus lactis*.subsp *lactis*.

La présence des espèces de *Lc lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, et *Lc lactis* subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis*, dans le lait cru de chamelle a été précédemment décrite dans la littérature.

Ces nouvelles souches de lactocoques ont montré des potentialités protéolytiques intéressantes.

4. Conclusion et perspectives

4. Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude de l'activité protéolytique chez des souches de bactéries lactiques isolées d'un échantillon de lait cru de chamelle collecté dans la région de Laghouat. Après isolement sur milieu de culture MRS, Nous avons procédé à une caractérisation phénotypique de ces souches, puis la recherche de leur activité protéolytique.

L'identification de souches isolées est basée sur les techniques qui caractérisent la morphologie et les différents métabolismes biochimiques et physiologiques. Les résultats obtenus ont permis d'attribuer ces isolats au genre *Lactococcus*.

Les résultats obtenus ont montré que les souches testées sont protéolytiques quelque soit la composition du milieu de culture utilisé (milieu MRS-Agar-Lait ou milieu Agar-lait).

Les souches étudiées ont montré qu'elles possèdent de nombreux critères de sélection des souches requises pour des applications technologiques ainsi que pour des recherches fondamentales. Elles présentent en effet d'importantes capacités pour être utilisées dans l'industrie alimentaire vu qu'elles possèdent un potentiel protéolytique intéressant.

Suite aux résultats obtenus, de nombreuses perspectives peuvent être formulées.

Ces souches nouvellement isolées pourraient faire l'objet d'une identification phénotypique plus complète (galeries API) ainsi que d'une éventuelle caractérisation génotypique par des techniques moléculaires afin de mieux les exploiter.

D'autre part, ces souches qui ont exprimé une activité protéolytique extracellulaire pourraient être utilisées pour la production de protéases, qui, après extraction et purification pourraient servir à la production d'hydrolysats protéiques alimentaires susceptibles de contenir des peptides biologiques.

5. Références
bibliographiques

A

Agrawal R.P., Swami S.C., Beniwal R., Kochar D.K., Sahani M.S., Tuteja F.C., Ghouri S.K. (2003). Effect of camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes : a randomised prospective controlled study. *J. Camel Res. Pract.*,10, 45-50

Atlan D., Laloi P., et Portalier R. (1989). Isolation and characterization of aminopeptidase deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants . *Appl .Envir .Microbiol.*1717-1723.

Axelsson, L., (2004). Classification and physiology. In: Salsinen, S., Wright, A.V., Ouwehand, (Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3ed edition). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633, 1 - 66.

B

Broadbent, J. R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M. E., Steele, J. L. (2002). Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology.* 68, 1778-1785.

Bounouala, F.Z. (2019). Hydrolyse des caséines par des souches de bactéries laitières.fractionnement et caractérisation des peptides générés. Thèse de Doctorat en biotechnologie microbienne. Université Oran 1 – Ahmed Ben Bella.

C

Christensen, J.E., Dudley ,E.G, Pederson ,J.A. & Steele, J.L. (1999).Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:217–246.

Chantawannackul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S. M. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented Soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28, 241-245.

Corrieu G., Luquet F M., (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France : pp 472 -676.

D

Desmazaud, M. J. & De Roissart, H. (1994). Métabolisme générale des bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Lorica, France. Pp : 169-207.

Desmazeaud M., 1983 - Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. *Technique laitière*: 976 : pp11-14.

Desmazeaud, M. J. (1992). Les bactéries lactiques. In Les groupes microbiens d'intérêts laitiers. Ed. Lenoir, J., Hermier, J., Weber, F. CEPIL, Paris. p. 9-60.

Desmazeaud, M. J. (1998). Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherche laitière. INRA.

Devoyod, J.J., Poullain, F. (1988). Les Leuconostocs. Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, 68: 249- 279.

Drider D., Prevost H., (2009). Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme,Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp 381- 427.

De Roissart, H. B et Luquet, F.M. (1994). Bactéries lactiques, Vol I et II Lorica Chemin saint Georges, F-38410 France.

E

Erdös, E. G., Skidgel, R. A. (1987). The angiotensin I-converting enzyme. Laboratory investigation; *a journal of technical methods and pathology*, 56(4), 345.

F

Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000).Streptococcus thermophilus cell wall-anchored proteinase. Release, purification, and biochemical andgenetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4772-4778.

G

Guertarni, H. (2013). Effet antibactérien des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus algériens sur la croissance de Helicobacter pylori. Thèse de doctorat. Université d'Oran EsSenia. 220 p.

Guss, (M. L.) and Delwiche(E. A.) (1954). - Streptococcus thermophilus. I. *Bacteriol.*, 67, 714-717.

Gafner Jean-Louis., (2012). La qualité microbiologique des aliments pour animaux,Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 1725 Posieux.

Gobbetti M, Folkertsma B, Fox P. F, Coretti A, Smacchi E, De Angelis M, Rossi J,Kilcawley K et Cortini M. (1996). Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *International Dairy Journal* 9.763-773.

Guldfeldt, L. V ., Sorensen, k.I., Stroman, P., Behrndt, H., Williams, D., Johanson E.(2001). Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar Cheese Ripening .Int.Dairy.J.373-382.

H

Hassen, A. N. & Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. In Marth, E. H. Food Science and Technology. Marcel Dekker, New York. Pp: 151-206.

Habib M., Ibrahim W., Schneider-Stock R., Hassan H. 2013. Camel milk lactoferrine reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. Food Chem., 141, 148-152

Hamad E.M., Abdelrahim E.A., Romeih E.A. 2011. Beneficial effect of camel milk on liver and kidneys function in diabetic Sprague-Dawley rats. Int. J. Dairy Sci., 6(3), 190-197.

Hancock, R. E., Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature biotechnology, 24(12), 1551-1557.

Hansal N. (2015) Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle. Mémoire de magister en Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université d'Oran 1, 154p.

Hassaine, O. (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin de sud algérien .

Hutkins R.W. (2001). Metabolism of starter cultures. In Applied Dairy Microbiology, Marth E.H., et Steele. J.L. Ed. Marcel Dekker, New York. 207-241.

I

Imbert M., Bondaue R., (1998) .On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. Curr. Microbiol. 37: pp 64-66.

J

Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M., Richard, J. (1996). Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. Le Lait, 76, 13-24.

Jakob E., Piccinali P.(2006). L'amertume dans les fromages. Agroxope. Liebefeld posieux, 1-16.

Juillard V, Laan H, Kunji E, Jeronimus-Stratingh CM, Bruins A. & Konings W (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal Bacteriology* 177:3472–3478.



Kabadjova, H.P., Bakalova, S., Gocheva, B., Moncheva, P. (2006). Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20, 89-94.

Kamaly, K. & Marth, M. E. H. (1989). Enzyme Activities of Lactic Streptococci and their role in maturation of cheese. *Journal of Dairy Science*, 72: 1945-1966.

Kim, S. K., Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts-a review. *Food Research International*, 39(4), 383-393.

Ko, S. C. et Jeon, Y. J. (2013). Marine peptides for preventing metabolic syndrome. *Current Protein and Peptide Science*, 14(3), 183-188.

Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 15-42.

Konings, W. N., Poolman, B., Driessen, A. J. M. (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC. Critical Review Microbiology*, 16, 419-476.

Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.

Kunji, E.R., Hagting, A., De Vries, C.J., Juillard, V., Haandrikman, A.J., Poolman, B., & Konings, W.N. (1995) Transport of beta-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal Biology Chemistry* 270:1569-1574.

König, H. & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganismen on Graps, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 522 p.



Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., (1977). A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol 42: pp123-133.

Lenoir J., Hermier J., Weber F.(1992). Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 3050.

- Letrot C., Juillard V., 2001** - Development of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of streptococcus thermophilus .J. APPL. Microbiol: 91: pp 1023-1029.
- Leveau, J. Y. & Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 612 p.
- Lane, C. N. & Fox, P. F. (1996).** Contribution of starter and Adjunct Lactobacilli to Proteolysis in Cheddar Cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 6 : 715-728.
- Lanfermeijer, F.C., Picon, A., Konings, W.N., Poolman, B., (1999).** Kinetics and consequences of non-and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein OppA of Lactococcus lactis Biochemistry .14440-14450.
- Larpent J.P., (1997).** Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 10 -73P.
- Law Barry A, Jens Kolstad. (1983).** Proteolytic systems in lactic acid bacteria.
- Lee, S. H., Qian, Z. J. et Kim, S. K. (2010).** A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.
- Léonil J., et Maubois. J.L. (2002).** Milk-derived bioactive peptides and proteins: future genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 461-467.
- Lynch, C. M., Mc Sweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. & Drinan, F. D. (1997).** Contribution of starter Lactococci and no starter Lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, 77: 441-459.



- Mc Sweeney, P.L.H. (2004).** Biochemistry of Cheese Ripening. *Int. J. Dairy Technol.*127144.
- Mcleod A., Nyquist O. L., Snipen L., Naterstad, K., And mehaia M. A. , 1995.** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, 50, 260-263.
- Menad, N. (2017).** Effet antlagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache a-vis de Salmonella sp.Thèse de doctorat. Mostaganem : Facuté des sciences de la nature et la vie.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G., Kim, S.K. (2005a).** Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Science*, 77, 2166-2178.

- Messaoui, H. (2013).** Protéolyse et autolyse de souches de lactobacilles d'origine laitiers. Etude de leur aptitude à hydrolyser les caséines et les protéines de poisson. Mémoire de Magistère. Université d'Oran. Algérie.
- Mills, O. E. & T. D. Thomas.(1981).** Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. N. Z. J. Dairy Science. Technology. 16:43–55.
- Monnet V., Chapot-Chartier M .P .& Gripon J.c. (1993).** Les peptides des lactocoques. Lait 73, 97-108.
- Monnet, V., Chapot-Chartier, M.P., Gripon, J.C. (1993).** Les peptidases des lactocoques. Lait .97-108.
- Martensson, O. (2002).** Lactic acid bacteria fermentation in OAT-based suspension. Doctoral thesis, Lund university, Sweden.
- Mazali J., (1992).** Bioconversion de permeat de lactosérum par de cellules lactobacilles in mobilisées sur un support solide. Mémoire. Université du Québec. INRS-EA: pp 5-7.
- Montel, M. C., Béranger, C., Bonnemaire, J. (2005).** Les fermentations au service des produits de terroir. INRA, Paris.
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore.



- Naceur, B. (2017).** Caractérisation technologique et sanitaire des enterocoques isolés à partir de lait de chamelle de l'algérien. these de doctorat. Telemcen : laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement.
- Nasri, R, Amor, I. B., Bougateg, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Châabouni, M. K., Nasri, M. (2012).** Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. Food Chemistry, 133(3), 835-841.
- Poolman, B. (1993).** Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12, 125-148.



- Pandey A., Bringel F., Meyer J M., (1994).** Iron requirement and 5 earch forside rophoresincactic acid bacteria. Apple. Microbiol. Biotechnol: 40: pp 735-739.
- Poolman, B. (1993).** Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12, 125-148.

Poolman, B., Kunji, E. R., Hagting, A., Juillard, V. & Konings, w. n. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Sac appl Bacteriol Symp Ser* 24, 65S-75S.

Q

Qian, Z. J., Je, J. Y., Kim, S. K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8398-8403.

R

Ramasamy, V., Natarajan, A. M. (1981). Purine and pyrimidine requirements of active lactic acid bacteria. *Dairy Science Abstracts*, 43, 283.

Rizzello C. G, Losito I, Gobetti M., Carbonara T., De Bari M. D., Zambronin P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *J. Dairy. Sci.* 88: 2348-2360.

Rodrigues, U. M., Aguirre, M., Facklam, R. R., and Collins, M. D., 1991. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol.*71: 509-516.

S

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

Selby-Smith, J., Hillier, A. J., Lees, G. J., Jagos, G. R. (1975). The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *Journal of Dairy Research*, 42, 132-138.

Settanni, L. et Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, 27, 691–697.

Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy. Sci.* 83: 1434-1440.

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

Siboukeur A., Siboukeur O. (2012). Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle collecté localement en comparaison avec le lait bovin. *Annales des Sciences et Technologie* Vol. 4, N° 2. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Siezen, R.J., 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76(1-4), 139-155.

Sofia V., Silva F., Malcata X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15: 1-15.

Stiles, ME., Holzapfel, WH. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal Food Microbiology*, 36 (1), 1-29.



Vandamme, P., pot, B., Gillis, M., DE vos, ., Kersters, K., and J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial SWINGS systematics. *Microbiol Rev.*60: 407438.

Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E. ; Jevaba, I., Chuat, V., Lortal, S., Grard , T., Guerardel, Y., Sadovskaya, I. (2013). Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BROI, and LH1. *Carbohydrate Research* , 379, 7-12.



Wang, Z., Wang, G. (2004). APD : the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*, 32, D590-D592.

Williams, A. G., Noble, J. & Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International of Dairy Journal*, 11: 103-115.



Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J., Zeng, M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 10281033.

Annexes

Annexe I : Milieux de culture

1. La composition des différents milieux est exprimée (g/L)

- **Gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe., 1960)**

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate di potassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate triammonique	2 g
Sulfate de magnésium	200 mg
Sulfate de manganèse	50 mg
Agar	18 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6,5 +/- 0,1,	
Stérilisation à l'autoclave (120 °C pendant 20 minutes)	

- **Milieu MRS-BCP**

Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	10g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium.....	2g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0,25g
MnSO ₄	0,05g
Pourpre de bromocrésol.....	0,025mg
Eau distillée.....	1000 ml
pH=6,8	
Stérilisation à l'autoclave (120 °C pendant 20 minutes)	

- **Eau physiologie :**

Composant.....g/l
 Chlorure de sodium.....8,5g
 Peptone.....0,5g
 Eau distillée.....1000 ml

pH=7.

Stérilisation à l'autoclave (120 °C pendant 20 minutes)

- **Bouillon hypersalé**

Extrait de viande.....5g
 Glucose.....5g
 Peptone.....15g
 NaCl.....40/65g
 Eau distillé.....950 ml

Stérilisation à l'autoclave (120 °C pendant 20 minutes)

2. Préparation des milieux pour le test de protéolyse

- **Milieu solide MRS-lait (5%)**

Milieu MRS solide stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.....95%

Lait écrémé reconstitué stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 10 min.....5%

- **Gélose au lait (2%)**

Agar préparé avec l'eau distillée à 1.5%95%

Lait écrémé reconstitué à 10%5%

Annexe II : Coloration de Gram

Technique

Réaliser un frottis et le fixer.

Coloration : violet de gentiane phéniqué durant une minute. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.

Rincer à l'eau

Mordantage : recouvrir la lame de réactif de Lugol 1 minute (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).

Rincer à l'eau

Epreuve (alcoolo résistance) : Plonger 3 ou 4 fois une demi seconde dans un pot d'alcool puis rincer à l'eau du robinet immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram moins sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram moins sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram plus ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet.

Contre coloration : Fuschine diluée au 1/20ème ou de safranine pendant une minute. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses.

Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.

Observer à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.