الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية وزارة التعليم
العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département des Sciences Biologiques



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :

Microbiologie et contrôle de qualité

Intitulé

Étude des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Présenté par :

Mlle : KHABCHACHE IMANE
Mlle : CHAKENAR DOUNIA

mémoireDevant les membres du jury :

Président : Dr.	YSSAAD DJAMILA	Maître de conférences (B)	(U. Relizane)
Encadreur: Dr.	GHALOUNI ESSMA	Maître de conférences (A)	(U. Relizane)
Examinateur: Dr.	REGUIEG YSAAD Athmen	Maître de conférences (A)	(U. Relizane)

Année universitaire : 2025/2026



Remerciements

بسم الله الرحمان الرحيم

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le Tout-Puissant, de nous avoir donné la force, la patience et le courage de mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrante, Mme GHALOUNI Essma, pour son accompagnement, ses conseils avisés et son soutien constant tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à Mme YSSAAD Djamila, présidente du jury ainsi qu'à Monsieur REGUIEG YSAAD Athmen, examinateur de notre travail, pour l'intérêt qu'ils ont porté en acceptant d'évaluer ce mémoire.

Nous remercions chaleureusement tous nos enseignants pour la qualité de leur formation et leur dévouement.

Nous tenons aussi à remercier nos familles et nos proches pour leur soutien moral, leur patience et leurs encouragements tout au long de notre parcours.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.



Dédicace

Avec tout mon amour et ma profonde gratitude, je dédie ce travail,

À la petite fille que j'étais autrefois,

Tu es aimée, tu es entendue, tu es vue. Je suis devenue ce refuge sûr que tu espérais en silence, cette force tranquille que tu cherchais au milieu des tempêtes. Aujourd'hui, je te rends hommage avec tendresse et fierté, fière de la femme que je suis devenue, fière du chemin parcouru, des peurs surmontées et des rêves qui commencent à se réaliser. Ce mémoire est la preuve que nous n'avons jamais abandonné, malgré les difficultés. Il est pour toi.

À ma chère binôme,

Merci d'avoir partagé avec moi cette belle aventure, avec ses défis, ses moments de doute et ses réussites. Que ce travail soit le reflet de nos efforts et de notre persévérance. Je vous souhaite un avenir rempli de succès et de bonheur.

À ma chère mère,

Pour son amour infini, son soutien inconditionnel et tous les sacrifices qu'elle a consentis pour mon bonheur. Ta présence à mes côtés a toujours été ma plus grande force et mon plus beau refuge.

À mon cher père,

Les mots ne suffiront jamais à exprimer toute ma reconnaissance. Merci pour ta patience infinie, pour ces cinq années durant lesquelles tu m'as accompagnée chaque jour à l'université, sans jamais te plaindre,
avec le même dévouement et le même sourire.
Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir rendu ce parcours possible.
Ce travail est aussi le fruit de tous tes efforts.



À mes chers frères,

Merci pour votre présence dans ma vie, pour vos encouragements, votre soutien et tous les moments partagés.
Que cette réussite soit aussi une source de fierté pour vous.

À mes chères amies,

Merci pour votre présence, votre gentillesse,
votre écoute et vos encouragements précieux.
Votre soutien a rendu ce parcours plus léger et plus beau.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin et qui ont contribué à la réalisation de ce travail, je leur adresse ma sincère gratitude.

Imane



Dédicace

Avec tout mon amour et ma reconnaissance, je dédie ce travail

À moi-même, et à ma chère binôme,

À notre collaboration, notre courage et notre persévérance tout au long de ce parcours universitaire.

Je nous souhaite un avenir plein de réussite, de bonheur et de succès.

À ma chère mère,

Pour son amour infini, son soutien et ses sacrifices, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mon cher père,

Je remercie mon père qui est la personne qui m'a le plus encouragée et qui m'a donné la force de continuer.

Je le remercie pour tous ses efforts et son soutien.

Merci pour les sacrifices qu'il a faits afin de me permettre d'étudier dans de bonnes conditions.

Je lui suis également reconnaissante pour sa confiance en moi et pour son encouragement tout au long de mes études.

À mes chères sœurs,

Pour leur sagesse et leurs précieux conseils, elles ont toujours été présentes pour croire en moi, me soutenir, m'encourager et me conseiller.

À mes chères amies,

Merci pour votre présence, votre gentillesse et votre encouragement précieux.



Dounia

Résumé

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes bénéfiques largement utilisés dans la fermentation et la conservation des aliments. Cette étude a porté sur l'isolement, l'identification et la caractérisation technologique de bactéries lactiques isolées à partir d'échantillons de lait cru de vache et de beurre traditionnel collectés dans la wilaya de Relizane.

Sept souches ont été isolées et identifiées sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques. Elles ont été rattachées aux genres *Leuconostoc* (VR1, VR2, BR1, VS1, BS2), *Lactococcus* (VS2) et *Aerococcus* (BS1).

Six souches ont été retenues en vue d'évaluer leurs aptitudes technologiques, notamment leur capacité à croître sur le lait écrémé et à produire des exopolysaccharides (EPS). Toutes les souches ont présenté une croissance dans le lait, avec une augmentation notable de la densité optique après 24 heures d'incubation.

La mise en évidence de la production d'EPS a été réalisée sur milieu MRS hyper-saccharosé, sur milieu au rouge de ruthénium et par le test du « fil » (Ropiness).

L'ensemble des souches a présenté un aspect visqueux et filant, confirmant leur potentiel de production d'EPS. Le dosage de ces derniers a révélé des concentrations variables selon les souches, allant de 62,93 à 125,13 µg/ml.

Enfin, un test d'antibiorésistance a montré une faible sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques testés (tétracycline, érythromycine, ceftazidime et ampicilline).

Ces résultats permettent de proposer certaines de ces souches comme sources potentielles d'EPS valorisables dans le domaine agroalimentaire et biotechnologique.

Mots-clés : bactéries lactiques, isolement, identification, exopolysaccharides, croissance, antibiorésistance.

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are beneficial microorganisms widely used in food fermentation and preservation. This study focused on the isolation, identification, and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk and traditional butter samples collected in Relizane province.

Seven strains were isolated and identified based on their phenotypic characteristics. They were assigned to the genera *Leuconostoc* (VR1, VR2, BR1, VS1, BS2), *Lactococcus* (VS2), and *Aerococcus* (BS1).

Six strains were selected to evaluate their technological capabilities, particularly their ability to grow in skim milk and produce exopolysaccharides (EPS).

All strains showed growth in milk, with a notable increase in optical density after 24 hours of incubation. The detection of EPS production was carried out on hyper-sucrose MRS medium, on ruthenium red medium, and by the ropiness test. All the strains exhibited a viscous and stringy appearance, confirming their EPS-producing potential.

The measurement of these substances revealed variable production depending on the strains, with values ranging from 62.93 to 125.13 µg/ml.

Finally, an antibiotic resistance test showed low sensitivity of the strains to the tested antibiotics (tetracycline, erythromycin, ceftazidime, and ampicillin).

These results allow us to propose some of these strains as potential sources of EPS that can be valorized in the agri-food and biotechnological fields.

Keywords: lactic acid bacteria, isolation, identification, exopolysaccharides, growth, antibiotic resistance.

ملخص

البكتيريا اللبنية هي ميكروبات مفيدة تُستخدم على نطاق واسع في التخمر وحفظ الأغذية. تناولت هذه الدراسة عزل وتحديد وتوصيف تكنولوجي للبكتيريا اللبنية المعزولة من عينات من حليب الأبقار الخام والزبدة التقليدية التي تم جمعها في ولاية غليزان.

تم عزل وتحديد سبع سلالات بناءً على خصائصها الظاهرية. تم ربطها بالأجناس : *Leuconostoc* (VR1, VR2، BR1، VS1، BS2)، *Lactococcus* (VS2) و*Aerococcus* (BS1). تم اختيار ست سلالات لتقييم قدراتها التكنولوجية، لا سيما قدرتها على النمو في الحليب منزوع الدسم وإنتاج السكريات المتعددة الخارجية (EPS) .جميع السلالات أظهرت نموًا في الحليب، مع زيادة ملحوظة في الكثافة الضوئية بعد 24 ساعة من الحضانة.

تمت إبراز إنتاج EPS على وسط MRS عالي السكروز، وعلى وسط أحمر الروثينيوم، ومن خلال اختبار "الخيط " (ropiness)قدمت جميع السلالات مظهرًا لزجًا وقابلًا للتمدد، مما يؤكد قدرتها على إنتاج EPS .أظهر قياس هذه الأخيرة إنتاجيات متغيرة حسب السلالات، بقيم تتراوح بين 62.93 و125.13 ميكروغرام/مل.

أخيرًا، أظهر اختبار مقاومة المضادات الحيوية حساسية منخفضة للسلالات تجاه المضادات الحيوية المختبرة (التتراسيكلين، الإريثروميسين، السيفتازيديم والأمبيسيلين).

تسمح هذه النتائج باقتراح بعض هذه السلالات كمصادر محتملة للسكريات المتعددة الخارجية القابلة للتثمين في المجال الزراعي والغذائي والتكنولوجي الحيوي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، العزل، التعريف، السكريات المتعددة الخارجية، النمو، مقاومة المضادات الحيوية.

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : degré Celsius

µl: microlitre

ADN : Acide désoxyribonucléique

AM : Ampiciline

ARN : acide ribonucléique

ATB : antibiotique

BL : bactéries lactiques

ADH : Arginine Dihydrolase

API : Analytical Profile Index

BL : bactéries lactiques

CAZ : Ceftazidime

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène-diamine tétra-acétique

EFSA: European Food Safety Authority

EPS: Exopolysaccharides

g: gramme

h: heure

LAB: lactic acid bacteria

MRS: Man, Rogosa Sharp

ml: millilitre

R^2 : coefficient de corrélation

RPM : Rotation Par Minute

***sp.* :** espèce non identifié d'un genre

***spp.* :** différentes espèces du même genre

ssp. ou ***subsp.*** : sous-espèce

T_0 : Temps initial

T_{24} : Temps après 24 heures d'incubation

µg : microgramme

µg/ml : microgramme par millilitre

Liste des tableaux

Tableau 1: principaux genres des bactéries lactiques et leurs caractéristiques 5
Tableau 2: identification biochimique des sept souches isolées 31
Tableau 3: profils biochimiques des souches identifiées par la galerie API 20 Strep. 32
Tableau 4: évolution de la densité optique des souches étudiées entre T_0 et T_{24} 36
Tableau 5: concentration standards et valeurs de la densité optique de la gamme étalon 40
Tableau 6: valeurs de la densité optique et de la concentration des EPS produites par les souches étudiées 40

Liste des figures

Figure 1: *Streptococcus thermophilus,* au microscope électronique.....6
Figure 2: *Lactococcus lactis* au microscope électronique.....7
Figure 3: *Leuconostoc mesenteroides* au microscope électronique.....8
Figure 4: *Pediococcus* au microscope électronique.....8
Figure 5: *Lactobacillus casei* au microscope électronique 9
Figure 6 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique 10
Figure 7 : courbe de croissance des bactéries lactiques montrant les différentes phases de développement.....11
Figure 8: Structure de l'unité répétitive des EPS produits par *Lactobacillus spp*.....17
Figure 9 : Représentation schématique des effets bénéfiques possibles des EPS au niveau de l'organisme humain 21
Figure 10: localisation des deux régions où les échantillons de lait et de beurre ont été prélevés (Google Maps) 22
Figure 11: préparation des dilutions décimales 23
Figure 12: méthode de conservation des isolats bactériens dans un milieu de culture supplémenté en glycérol.....25
Figure 13: aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu MRS 29
Figure 14: observation microscopique des souches après coloration de Gram, au grossissement (G 10 x100).....30
Figure 15: résultat du test de la catalase.....30
Figure 16: Profil fermentaire de la souche VR1, rattachée au genre *Leuconostoc spp* 33
Figure 17: Profil fermentaire de la souche VS2 identifiée comme *Lactococcus lactis ssp. lactis*.....34
Figure 18: Profil fermentaire de la souche BS1, identifiée comme *Aerococcus viridans*.....34
Figure 19: première préculture des souches réalisée sur milieu MRS 35
Figure 20: deuxième préculture des souches réalisée sur milieu lait écrémé.....35
Figure 21: évolution de la densité optique des souches lactiques entre T_0 et T_{24} 36
Figure 22: Aspect des colonies sur milieu MRS hyper saccharosé 38
Figure 23: Aspect des colonies sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium.....39
Figure 24: aspect filant des souches bactériennes lactiques sur milieu hyper saccharosé 39
Figure 25: Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des concentrations des EPS, pour les six souches 41
Figure 26: Exemple du résultats de l'antibiogramme de la souche de *Leconostoc sp* vis-à-vis des antibiotiques testés.....42
Figure 27: exemple du résultats de l'antibiogramme de la souche de *Lactococcus lactis* vis-à-vis des antibiotiques testés 43

Sommaire

Liste des abréviations	**i**
Liste des tableaux	**ii**
Liste des figures	**iii**
Introduction	**1**
1.Synthèse bibliographique	
1.1.les bactéries lactiques	**3**
1.1.1. Définition	**3**
1.1.2. Historique	**3**
1.1.3. Caractéristiques des bactéries lactiques	**4**
1.1.4. Habitat des bactéries lactiques	**4**
1.1.5. Principaux genres des bactéries lactiques	**5**
1.1.6. Caractéristiques des principaux genres des BL	**5**
1.1.6.1. Le genre *Streptococcus*	**6**
1.1.6.2. Le genre *Lactococcus*	**6**
1.1.6.3. Le genre *Leuconostoc*	**7**
1.1.6.4. Le genre *Pediococcus*	**8**
1.1.6.5. Le genre *Lactobacillus*	**9**
1.1.6.6. Le genre *Enterococcus*	**10**
1.1.7. Croissance des bactéries lactiques	**10**
1.1.8. Métabolisme des bactéries lactiques	**12**
1.1.9. Activités d'intérêt technologique des BL	**12**
1.1.10. Résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques	**15**
1.1.10.1. Les mécanismes de résistance	**15**
1.2. Les exopolysaccharides (EPS) des bactéries lactiques	**17**
1.2.1. Définition	**17**
1.2.2. Biosynthèse des EPS	**18**
1.2.3. Production des EPS	**18**
1.2.3.1. Facteurs influençant la production des EPS	**19**
1.2.4. Méthodes de détection des EPS	**19**
1.2.5. Importance des EPS	**20**
2. Matériels et méthodes	
2.1. Objectif de l'étude	**22**
2.2.Lieu et période d'étude	**22**
2.3. Echantillonnage	**22**
2.4. Isolement et purification des souches	**23**
2.4.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales	**23**
2.4.2. Isolement des bactéries lactiques	**23**
2.4.3. Purification des isolats	**23**
2.4.4. Analyse des isolats	**24**
2.4.5. Conservation des souches	**24**
2.5. Identification des isolats	**25**

2.6. Étude de la croissance **26**
2.7. Mise en évidence de la production des EPS **26**
2.7.1. Culture sur milieu MRS hyper-saccharosé **26**
2.7.2. Culture sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium **27**
2.7.3. Test du « fil » (Ropiness) **27**
2.8. Dosage des Exopolysaccharides (EPS) **27**
2.9. Étude de la sensibilité aux antibiotiques **28**
3. Résultats et discussion
3.1. Isolement des bactéries lactiques **29**
3.1.1. Caractéristiques macroscopiques **29**
3.1.2. Caractéristiques microscopiques **29**
3.1.3. Test de la catalase **30**
3.2.Identification des souches **31**
3.3.Caractérisation technologique des souches **35**
3.3.1. Première préculture des souches **35**
3.3.2. Deuxième préculture des souches **35**
3.3.3. Étude de la croissance bactérienne **36**
3.3.4. Culture sur milieu MRS hypersaccharosé **37**
3.3.5. Culture sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium **38**
3.3.6. Test du Ropiness **39**
3.3.7. Dosage des exopolysaccharides (EPS) **40**
3.3.8. Étude de la sensibilité aux antibiotiques **42**
4. Conclusion 44
5. Références 45
6. Annexes 53

Introduction

Les produits laitiers occupent une place importante dans l'alimentation humaine en raison de leur richesse en protéines, vitamines, minéraux et autres nutriments essentiels. Parmi ces produits, le lait de vache et le beurre constituent des matrices biologiques favorables au développement d'une flore microbienne diversifiée, comprenant notamment les bactéries lactiques. Ces microorganismes jouent un rôle fondamental dans le processus de fermentation et contribuent à l'amélioration de la qualité microbiologique, nutritionnelle et sensorielle des aliments (Holzapfel et *al*., 2001 ; Dortu et Thonart, 2009).

Au-delà de leur rôle dans la fermentation, les bactéries lactiques sont reconnues pour leur capacité à produire diverses substances d'intérêt, telles que les bactériocines, les enzymes et les exopolysaccharides (EPS). Ces derniers sont des polymères glucidiques extracellulaires synthétisés par certaines souches bactériennes et libérés dans le milieu environnant ou associés à la surface cellulaire. Ils jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les conditions environnementales défavorables et participent à différents mécanismes physiologiques, notamment l'adhésion cellulaire et la formation de biofilms (Kranenburg et *al*., 1999 ; De Vuyst et Degeest, 1999).

Les exopolysaccharides suscitent actuellement un intérêt croissant en raison de leurs nombreuses applications technologiques. Dans les produits fermentés, ils contribuent à l'amélioration de la texture, de la viscosité, de la stabilité et de la capacité de rétention d'eau. Ils permettent également de réduire certains défauts technologiques tout en améliorant les caractéristiques sensorielles des aliments. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence leurs propriétés biologiques potentielles, notamment leurs activités antioxydantes, immunomodulatrices et protectrices, ce qui renforce leur intérêt dans les secteurs agroalimentaire et biotechnologique (Ruas-Madiedo et *al*., 2005 ; Badel *et al*., 2011).

Dans ce contexte, l'isolement et la sélection de nouvelles souches de bactéries lactiques capables de produire des EPS représentent un domaine de recherche particulièrement prometteur. L'identification précise de ces microorganismes ainsi que l'étude de leurs caractéristiques technologiques permettent d'évaluer leur potentiel d'utilisation dans la fabrication de produits fermentés à valeur ajoutée et dans le développement d'ingrédients fonctionnels d'origine naturelle.

Le présent travail porte sur l'étude des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache et du beurre. Il a pour objectif l'identification des souches isolées, l'évaluation de certaines de leurs caractéristiques technologiques, notamment leur aptitude à croître dans le lait, ainsi que la mise en évidence de la production d'exopolysaccharides.

Cette étude vise également à apprécier leur potentiel technologique en vue d'éventuelles applications dans le domaine agroalimentaire.

Afin d'atteindre ces objectifs, ce mémoire est structuré en trois parties. La première partie présente une synthèse bibliographique consacrée aux bactéries lactiques et aux exopolysaccharides. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de l'étude expérimentale. Enfin, la troisième partie est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

1. Synthèse bibliographique

1.1. Les bactéries lactiques

1.1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont un groupe de micro-organismes bénéfiques présents tant dans l'environnement que dans le tractus digestif humain. Employées depuis longtemps dans l'alimentation, elles occupent aujourd'hui une place importante dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents de fermentation. Bien qu'elles soient principalement associées aux produits laitiers, leur utilisation s'étend également à la transformation des légumes, des viandes, des poissons, ainsi qu'à la panification et à la production de vin. De plus, elles sont généralement reconnues comme sûres et possèdent le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Vescovo et *al*., 1996 ; Dortu & Thonart, 2009 ; Moraes et *al*., 2010).

1.1.2. Historique

L'utilisation des bactéries lactiques remonte à des périodes très anciennes, bien avant que leur nature microbiologique ne soit comprise. Pendant des siècles, ces microorganismes ont été exploités de manière empirique dans la transformation et la conservation des aliments, notamment dans la fabrication de produits laitiers fermentés, de légumes saumurés et de pains, contribuant ainsi à améliorer leur stabilité et leurs qualités sensorielles (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Ce n'est qu'au XIXe siècle que leur rôle a été élucidé grâce aux travaux de Louis Pasteur, qui a démontré l'implication des microorganismes dans les phénomènes de fermentation. Il a notamment mis en évidence que la fermentation lactique résulte de l'activité de bactéries capables de transformer les glucides en acide lactique, posant ainsi les bases de la microbiologie moderne (Pasteur, 1857).

Au début du XXe siècle, Orla-Jensen a proposé une classification des bactéries lactiques fondée sur leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques, permettant de mieux structurer les connaissances sur ce groupe bactérien (Orla-Jensen, 1919).

Par la suite, les progrès en microbiologie ont permis de mieux comprendre leur diversité, leur métabolisme et leurs exigences nutritionnelles. Ces avancées ont favorisé leur utilisation à grande échelle dans l'industrie agroalimentaire, où elles jouent un rôle clé dans les procédés de fermentation et de conservation des aliments (Holzapfel et *al*., 2001).

Avec l'émergence des techniques de biologie moléculaire, l'étude des bactéries lactiques a connu un essor considérable. L'analyse génétique, notamment du matériel ribosomique, a permis d'affiner leur classification et de mieux comprendre leurs fonctions. De plus, leurs applications se sont étendues au domaine de la santé, en particulier pour leurs effets probiotiques, ainsi qu'à la production de composés d'intérêt comme les exopolysaccharides (Axelsson, 2004).

1.1.3. Caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, décrites initialement par Orla-Jensen (1919), constituent un groupe de micro-organismes capables de fermenter les glucides avec production d'acide lactique. Ce sont des procaryotes hétérotrophes appartenant aux chimio-organotrophes. Elles se caractérisent par un type Gram positif, une absence de mobilité et de sporulation, et une capacité à se développer en conditions micro-aérophiles ou aérotolérantes.

Sur le plan enzymatique, ces bactéries sont généralement dépourvues de catalase, bien que certaines puissent présenter une activité pseudo-catalasique. Elles ne possèdent ni nitrate réductase ni cytochrome oxydase. Leur croissance nécessite des milieux riches en nutriments, notamment en acides aminés, peptides, acides gras et glucides (Holzapfel et *al*., 2001 ; Gevers, 2002).

Les bactéries lactiques sont majoritairement mésophiles, bien que certaines souches puissent être psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent de manière optimale à des pH acides, généralement compris entre 4 et 4,5, tout en étant capables de tolérer des conditions plus extrêmes allant approximativement de pH 3,2 à 9,6 (Baliarda, 2003).

1.1.4. Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes largement distribués dans la nature et considérés comme ubiquistes. Elles occupent une grande diversité de niches écologiques, incluant notamment les milieux d'origine laitière, en particulier les produits fermentés, ainsi que les matrices carnées et végétales. Par ailleurs, elles font partie intégrante du microbiote des voies gastro-intestinales et urogénitales chez l'homme et les animaux. Leur présence a également été signalée dans divers environnements naturels, tels que les sols et les milieux aquatiques (Liu et *al*., 2014).

1.1.5. Principaux genres des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent plusieurs genres bactériens partageant des caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques communes, notamment *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*. Ces micro-organismes présentent des morphologies variées (coques ou bacilles) et se caractérisent par leur capacité à fermenter les glucides en produisant principalement de l'acide lactique. Certains genres, tels que *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, sont particulièrement étudiés pour leur aptitude à produire des exopolysaccharides, d'intérêt biotechnologique et industriel.

Tableau 1: principaux genres des bactéries lactiques et leurs caractéristiques.

Genre	Morphologie	Type de fermentation	Caractéristiques principales	Habitat / utilisation
Lactobacillus	Bacilles	Homo / hétérofermentaire	Gram +, catalase-, production d'acide lactique	Produits laitiers, tube digestif
Lactococcus	Coques en chaînes	Homofermentaire	Croissance rapide, production d'acide lactique	Industrie fromagère
Leuconostoc	Coques	Hétérofermetaire	Production de co2 et d'EPS	Légumes fermentés, produits laitiers
Pediococcus	Coques en tétrades	Homofermentaire	Tolérance au pH acide	Fermentations végétales
Streptococcus	Coques en chaînes	Homofermentaire	Certaines espèces thermophiles	Produits laitiers (yaourt)
Enterococcus	Coques	Homofermentaire	Résistance aux conditions difficiles	Intestin, aliments

1.1.6. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

Le regroupement des bactéries lactiques au sein d'un même ensemble phylogénétique a été confirmé par des études de taxonomie moléculaire fondées sur l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal (ARNr) (Leveau et Bouix, 1993). Ces microorganismes appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Enterococcus*, largement impliqués dans les fermentations alimentaires et les biotechnologies agroalimentaires (Axelsson, 2004).

1.1.6.1. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* regroupe des bactéries sphériques à Gram positif, généralement disposées en chaînes ou en paires. Ces bactéries possèdent des exigences nutritionnelles élevées et se développent principalement dans des milieux riches (Guiraud et Joseph, 1998). La majorité des espèces présentent un métabolisme homofermentaire conduisant essentiellement à la production d'acide lactique.

Certaines espèces du genre sont thermophiles, notamment *Streptococcus thermophilus*, largement utilisée dans l'industrie laitière pour la fabrication des yaourts et des produits fermentés. Cette espèce se distingue par son caractère non pathogène ainsi que par son adaptation aux milieux laitiers (Sutra et *al*., 1998).

Selon la classification de Bergey, le genre *Streptococcus* comprend plusieurs groupes bactériens différenciés selon leurs caractéristiques physiologiques et pathologiques, notamment les streptocoques pyogènes, les streptocoques oraux, les entérocoques et les streptocoques lactiques.

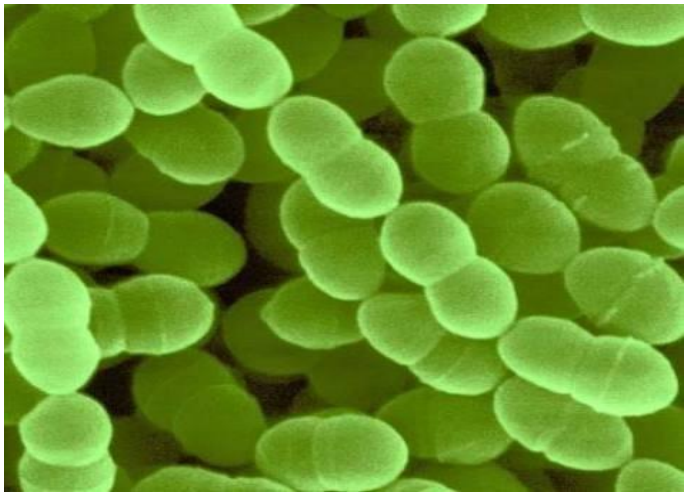


Figure 1: *Streptococcus thermophilus*, au microscope électronique **(Corrieu et Luquet, 2008).**

1.1.6.2. Le genre *Lactococcus*

Les bactéries du genre *Lactococcus* sont des coques à Gram positif, généralement mésophiles et homofermentaires, produisant majoritairement de l'acide lactique L(+) à partir des glucides fermentescibles (Leveau et Bouix, 1993). Ces bactéries jouent un rôle essentiel dans les fermentations laitières grâce à leur capacité à acidifier rapidement le lait.

Les espèces de ce genre sont largement utilisées dans la fabrication des fromages, des laits fermentés et d'autres produits laitiers. Elles sont considérées comme des microorganismes non pathogènes et présentent un intérêt technologique majeur dans l'industrie agroalimentaire (Sutra et *al*., 1998).

Le genre comprend principalement l'espèce *Lactococcus lactis*, subdivisée en plusieurs sous-espèces telles que *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* et *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, reconnues pour leurs propriétés fermentaires et aromatiques.

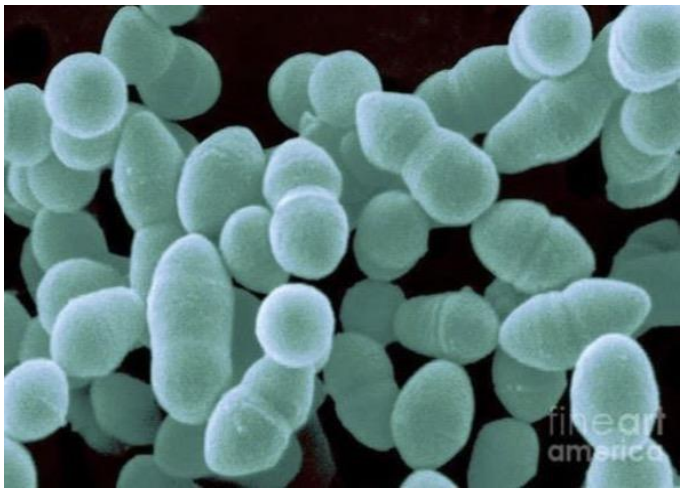


Figure 2: *Lactococcus lactis* au microscope électronique **(Corrieu et Luquet, 2008).**

1.1.6.3. Le genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* rassemble des bactéries coccoïdes à Gram positif, généralement disposées en paires ou en courtes chaînes. Ces bactéries sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire conduisant à la production d'acide lactique, de dioxyde de carbone et d'éthanol ou d'acide acétique (Sutra et *al.*, 1998).

Les espèces du genre *Leuconostoc* possèdent également la capacité de produire des composés aromatiques à partir du citrate, ce qui leur confère une grande importance dans certaines fermentations alimentaires. Cependant, certaines espèces peuvent également être responsables d'altérations dans les produits alimentaires riches en sucres ou en acides.

Ces bactéries sont principalement mésophiles avec une température optimale de croissance proche de 25°C. Leur teneur en bases guanine-cytosine (GC%) varie généralement entre 36 et 43 % (Leveau et Bouix, 1993).

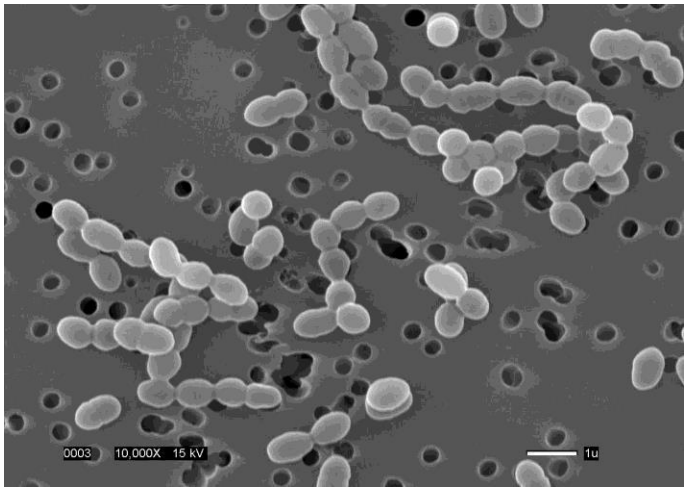


Figure 3: *Leuconostoc mesenteroides* au microscope électronique **(Wallace et *al*., 2003).**

1.1.6.4. Le genre *Pediococcus*

Les bactéries du genre *Pediococcus* sont des coques à Gram positif se présentant fréquemment en tétrades ou en paires. Elles possèdent un métabolisme homofermentaire et produisent principalement de l'acide lactique sous forme DL ou L(+) (Leveau et Bouix, 1993).

Ces bactéries sont généralement mésophiles et participent à certaines fermentations alimentaires. Toutefois, certaines espèces peuvent être responsables d'altérations dans les boissons fermentées, les produits végétaux ou les produits carnés, notamment par la production de viscosité anormale.

Les *Pediococcus* présentent une particularité de division cellulaire selon deux plans perpendiculaires, expliquant leur disposition caractéristique en tétrades (Leveau et *al.*, 1991).

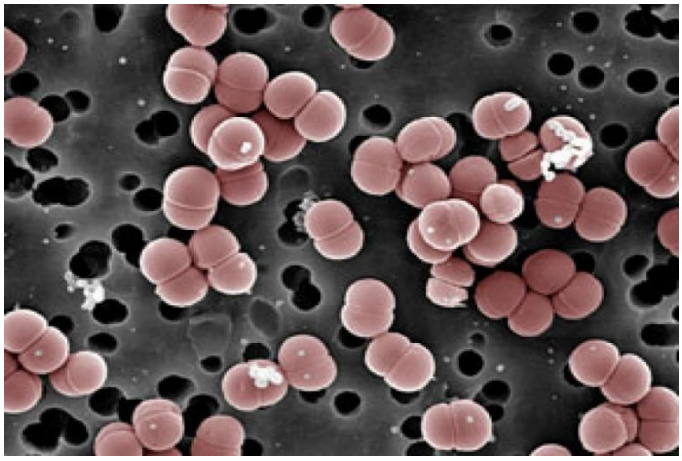


Figure 4: *Pediococcus* au microscope électronique **(Wallace et *al*., 2003).**

1.1.6.5. Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* constitue l'un des groupes les plus importants des bactéries lactiques. Il regroupe des bacilles à Gram positif pouvant être isolés, en paires ou en chaînes. Les espèces de ce genre peuvent présenter un métabolisme homofermentaire ou hétérofermentaire selon les voies métaboliques utilisées pour la fermentation des glucides (Guiraud et Joseph, 1998).

Les *Lactobacillus* interviennent dans de nombreuses fermentations alimentaires et sont largement utilisés dans les industries laitières, carnées et végétales. Certaines espèces possèdent également des propriétés probiotiques bénéfiques pour la santé humaine.

Selon la classification proposée par Orla-Jensen en 1919, le genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes principaux :

• Groupe I : *Thermobacterium*

Ce groupe comprend les lactobacilles thermophiles homofermentaires obligatoires produisant essentiellement de l'acide lactique. Ces bactéries se développent préférentiellement à 45 °C et comprennent notamment *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus acidophilus.*

• Groupe II : *Streptobacterium*

Les espèces de ce groupe sont des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs capables d'adapter leur métabolisme selon les conditions du milieu. Parmi les espèces importantes figurent *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus sakei*.

• Groupe III : *Betabacterium*

Ce groupe regroupe les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires utilisant principalement la voie des pentoses phosphates. Les espèces telles que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum* produisent plusieurs métabolites comme l'acide lactique, le CO_2 et l'éthanol.

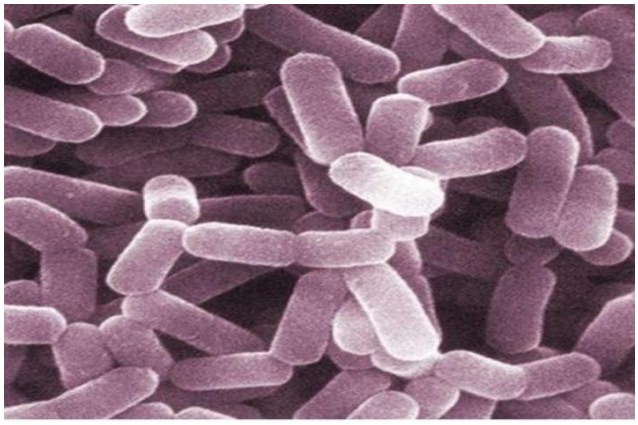


Figure 5: *Lactobacillus casei* au microscope électronique **(Corrieu et Luquet, 2008).**

1.1.6.6. Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe des bactéries coccoïdes à Gram positif pouvant se présenter sous forme isolée, en paires ou en courtes chaînes. Ces bactéries se distinguent par leur grande résistance aux conditions environnementales, notamment leur capacité à croître en présence de 6,5 % de NaCl, à pH alcalin et à des températures comprises entre 10 °C et 45 °C (Devriese et *al*., 1993 ; Zhang et Cai, 2014).

Les entérocoques possèdent un métabolisme homofermentaire et certaines espèces sont utilisées dans certaines fermentations traditionnelles. Toutefois, certaines souches peuvent présenter un intérêt médical en raison de leur résistance aux antibiotiques.



Figure 6 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique **(Wallace et *al*., 2003).**

1.1.7. Croissance des bactéries lactiques

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, notamment la disponibilité en nutriments, une température adéquate, une activité de l'eau suffisante, un pH approprié ainsi que l'absence de substances inhibitrices telles que les antiseptiques ou les antibiotiques, les bactéries lactiques présentent une croissance caractéristique décrite par une courbe spécifique (Buchanan, 1918).

Cette croissance se déroule classiquement en plusieurs phases successives, traduisant les différentes étapes d'adaptation et de multiplication des cellules bactériennes (De Roissart, 1986 ; Augustin, 2005).

La première étape correspond à la phase de latence, durant laquelle aucune augmentation du nombre de cellules n'est observée ($\mu = 0$). Cette phase débute immédiatement après l'ensemencement et reflète une période d'adaptation des bactéries à leur nouvel environnement.

Sa durée dépend de plusieurs facteurs, tels que la composition du milieu, l'état physiologique des cellules inoculées et la taille de l'inoculum.

Elle est suivie de la phase d'accélération, caractérisée par une reprise progressive de l'activité métabolique et le début de la multiplication cellulaire.

Ensuite, les bactéries entrent dans la phase exponentielle, où la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale ($\mu = \mu_{max}$). Durant cette étape, les cellules se divisent de manière régulière et rapide, et la croissance apparaît linéaire lorsque l'on représente le logarithme de la population bactérienne en fonction du temps.

Par la suite, la phase de ralentissement s'installe, marquée par une diminution progressive du taux de croissance. Ce phénomène est généralement lié à l'épuisement des nutriments essentiels, à l'accumulation de métabolites inhibiteurs tels que les acides organiques, ou encore à la baisse du pH du milieu.

La phase stationnaire correspond à un équilibre entre la division cellulaire et la mortalité, ce qui se traduit par une stabilisation de la population bactérienne ($\mu = 0$). À ce stade, la culture atteint sa densité maximale.

La phase de déclin est caractérisée par une diminution du nombre de cellules viables (μ négatif), due à l'épuisement des ressources énergétiques et à l'accumulation de substances toxiques, pouvant entraîner la mort et la lyse des bactéries.

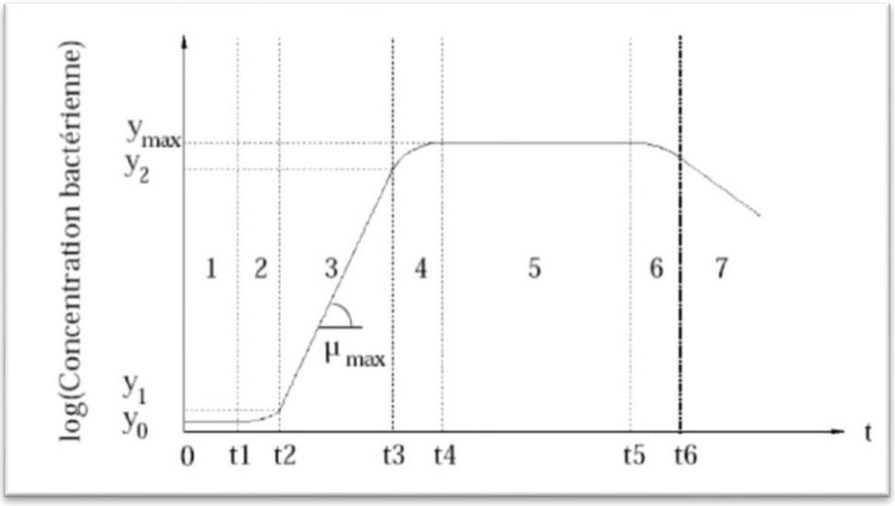


Figure 7 : courbe de croissance des bactéries lactiques montrant les différentes phases de développement par **Buchanan (1918).**

1.1.8. Métabolisme des bactéries lactiques

Le métabolisme des bactéries lactiques est principalement caractérisé par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique comme produit final majoritaire. Ce processus repose sur la glycolyse, où le glucose est transformé en pyruvate, puis réduit en acide lactique afin de régénérer le NAD^+ nécessaire à la continuité des réactions métaboliques. Cette voie métabolique constitue une caractéristique essentielle de ce groupe bactérien (Rogers et *al*., 2006 ; Prescott et *al*., 2010).

Selon les espèces, deux types de métabolisme fermentaire peuvent être distingués : le métabolisme homofermentaire, produisant essentiellement de l'acide lactique, et le métabolisme hétérofermentaire, générant en plus du lactate d'autres composés tels que l'éthanol, le dioxyde de carbone et des acides organiques. Cette diversité métabolique dépend des voies enzymatiques utilisées, notamment la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates (Rogers et *al*., 2006).

En outre, les bactéries lactiques sont capables de produire une large gamme de métabolites secondaires d'intérêt, incluant des composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines, ainsi que des enzymes impliquées dans la transformation des substrats alimentaires. Ces activités contribuent à la sécurité microbiologique et à la qualité des produits fermentés (Franz et *al*., 1998 ; Messens et De Vuyst, 2002).

Par ailleurs, leur métabolisme inclut également des activités enzymatiques telles que la protéolyse et la lipolyse, qui participent à la dégradation des macromolécules en composés plus simples. Ces transformations jouent un rôle déterminant dans le développement des caractéristiques organoleptiques, notamment la texture et l'arôme des produits fermentés (Molly et *al*., 1997 ; Talon et *al*., 2006).

1.1.9. Activités d'intérêt technologique des bactéries lactiques

En plus de leur aptitude à produire de l'acide lactique, les bactéries lactiques regroupent une grande diversité de genres et d'espèces présentant des caractéristiques morphologiques et physiologiques variées. Cette diversité se traduit par l'existence de nombreuses souches possédant des propriétés fonctionnelles importantes, telles que l'acidification, la dégradation des protéines et des lipides, la formation de composés aromatiques ainsi que l'amélioration des propriétés texturales des aliments (Muthukumarasamy et Holley, 2006 ; Casaburi et *al*., 2008 ; Salvucci et *al*., 2016).

1.1.9.1. L'activité acidifiante

L'acidification constitue l'une des fonctions majeures des bactéries lactiques dans les procédés de fermentation. Ces microorganismes transforment les glucides en acide lactique, entraînant une diminution progressive du pH du milieu. Cette activité dépend fortement de la composition du ferment et de l'interaction entre les différentes souches présentes, certaines associations permettant d'obtenir une acidification plus rapide ou plus intense. Par ailleurs, une variabilité importante de cette activité est observée, même au sein d'une même espèce (Visessanguan et *al*., 2006 ; Corrieu et Luquet, 2008).

La production d'acide lactique entraîne plusieurs effets, notamment l'amélioration de la saveur des produits fermentés, l'inhibition des microorganismes indésirables, ainsi que des modifications physico-chimiques comme la coagulation des protéines du lait. Ces transformations contribuent à la stabilité microbiologique et à la qualité finale des aliments (Béal et *al*., 2008 ; Monnet et *al*., 2008).

1.1.9.2. L'activité protéolytique

Les bactéries lactiques disposent d'un système enzymatique complexe permettant la dégradation des protéines en peptides puis en acides aminés. Ce système repose principalement sur l'action de protéases associées à la paroi cellulaire, suivie de l'intervention de diverses peptidases qui assurent une hydrolyse plus poussée des peptides (Monnet et *al*., 2008 : Menigjin et *al*., 2010).

Les enzymes impliquées, telles que les aminopeptidases, dipeptidases et tripeptidases, peuvent être localisées au niveau de la membrane ou du cytoplasme. Cependant, la croissance des bactéries lactiques peut être limitée par la faible disponibilité de certains acides aminés essentiels dans le milieu, ce qui souligne leur dépendance vis-à-vis de leur système protéolytique pour satisfaire leurs besoins nutritionnels (Bouton, 1992 ; Ho et *al*., 2007 ; Atlan et *al*., 2008).

1.1.9.3. L'activité lipolytique

La lipolyse correspond à l'hydrolyse des lipides, notamment des triglycérides du lait, en acides gras libres et autres composés intermédiaires. Cette activité joue un rôle déterminant dans le développement des arômes des produits fermentés, en particulier dans les fromages. Les acides gras libérés participent à la formation de composés aromatiques caractéristiques (Blaya et *al*., 2018).

Bien que les bactéries lactiques présentent généralement une activité lipolytique moins intense que d'autres microorganismes, certaines souches possèdent des enzymes intracellulaires, telles que les estérases et les lipases, capables de dégrader les lipides. Ces enzymes contribuent à la formation de composés responsables des qualités sensorielles des produits fermentés (Dortu et Thonart, 2009 ; Thierry et *al*., 2017).

1.1.9.4. L'activité aromatisante

Les bactéries lactiques interviennent également dans la formation des arômes des produits fermentés. Certaines espèces, notamment celles appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*, sont particulièrement impliquées dans la production de composés aromatiques tels que l'acétaldéhyde, le diacétyle et l'acétoïne. Ces molécules résultent de la transformation de substrats comme le citrate ou les acides aminés (Chen et *al*., 2017 ; Farag et *al*., 2020).

La production de ces composés dépend des voies métaboliques propres à chaque espèce ainsi que des conditions de fermentation. Les principales voies impliquées incluent la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse, qui contribuent ensemble à la complexité aromatique des aliments fermentés.

1.1.9.5. L'activité texturante

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS), des polymères glucidiques excrétés dans le milieu ou associés à la surface cellulaire. Ces composés jouent un rôle important dans l'amélioration de la texture des produits alimentaires, notamment en augmentant la viscosité et en réduisant la synérèse (Liu et *al*., 2010).

Les EPS sont constituées d'unités monosaccharidiques variées, telles que le glucose, le galactose ou le mannose, organisées en structures linéaires ou ramifiées. Certaines souches produisent également des polymères spécifiques comme les dextranes ou les lévanes. Dans les produits laitiers fermentés, ces composés contribuent à améliorer la consistance et les propriétés rhéologiques, comme c'est le cas pour les yaourts élaborés avec certaines souches de bactéries lactiques (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Khue et Ngoc, 2013 ; Finore et *al*., 2014).

1.1.10. Résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques revêt une importance particulière dans le domaine agroalimentaire. En effet, ces microorganismes sont largement utilisés comme ferments ou probiotiques, et il est essentiel de s'assurer qu'ils ne constituent pas un réservoir de gènes de résistance transmissibles. Ainsi, l'évaluation de leur profil de sensibilité aux antibiotiques fait partie des critères de sélection des souches destinées à des applications industrielles ou thérapeutiques (EFSA, 2012).

Les bactéries lactiques présentent des profils de sensibilité aux antibiotiques variables selon les espèces et les souches. Certaines d'entre elles possèdent une résistance naturelle, dite intrinsèque, qui résulte de caractéristiques structurales ou fonctionnelles propres à ces microorganismes. Cette résistance peut être liée, par exemple, à l'absence de cibles spécifiques pour certains antibiotiques ou à une faible perméabilité de la paroi cellulaire (Ammor et *al*., 2007).

En parallèle, des mécanismes de résistance acquise peuvent également être observés chez certaines souches. Ces mécanismes résultent soit de mutations génétiques, soit de l'acquisition de gènes de résistance via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons. Ce phénomène est particulièrement important en raison du risque potentiel de transfert horizontal de ces gènes vers des bactéries pathogènes, notamment dans le tractus gastro-intestinal (Mathur et Singh, 2005).

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont généralement sensibles à plusieurs classes d'antibiotiques, notamment les β-lactamines, mais elles peuvent présenter une résistance notable à d'autres, comme les aminoglycosides ou la vancomycine, selon les espèces. Par exemple, certaines espèces du genre *Enterococcus* sont connues pour leur résistance à la vancomycine, ce qui soulève des préoccupations en matière de sécurité sanitaire (Temmerman et *al*., 2003).

1.1.10.1. Les mécanismes de résistance

La résistance observée chez les bactéries lactiques repose sur différents mécanismes cellulaires et moléculaires permettant de limiter l'action des antibiotiques.

- **Modification de la cible de l'antibiotique**

Certaines bactéries lactiques peuvent modifier la structure de la molécule cible (ex. ribosome ou enzymes), ce qui diminue l'affinité de l'antibiotique et réduit son efficacité (Ammor et *al*., 2007).

- **Production d'enzymes d'inactivation**

Des enzymes spécifiques peuvent dégrader ou modifier chimiquement l'antibiotique, entraînant une perte de son activité (Mathur & Singh, 2005).

- **Diminution de la perméabilité membranaire**

La membrane cellulaire peut limiter l'entrée des antibiotiques, réduisant ainsi leur concentration intracellulaire (Delcour et *al*., 1999).

- **Systèmes d'efflux actif**

Les pompes d'efflux permettent d'expulser activement les antibiotiques hors de la cellule, empêchant leur accumulation à des concentrations toxiques (Gueimonde et *al*., 2013).

- **Résistance intrinsèque**

Certaines bactéries lactiques possèdent naturellement une résistance à certains antibiotiques en raison de leurs caractéristiques physiologiques ou structurales (Ammor et *al*., 2007).

- **Acquisition de gènes de résistance**

Les bactéries lactiques peuvent acquérir des gènes de résistance par transfert horizontal (plasmides, transposons), ce qui favorise la dissémination de la résistance (Mathur & Singh, 2005).

1.2. Les exopolysaccharides (EPS) des bactéries lactiques

Les exopolysaccharides (EPS) suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la microbiologie, en particulier en raison de leur implication dans les propriétés fonctionnelles des microorganismes. Produits par diverses bactéries, notamment les bactéries lactiques, ces biopolymères jouent un rôle important dans les interactions entre la cellule et son environnement (Kranenburg et *al.*, 1999 ; De Vuyst et Degeest, 1999).

Dans le secteur agroalimentaire, les EPS sont particulièrement étudiés pour leur capacité à améliorer les caractéristiques texturales et rhéologiques des produits fermentés. Par ailleurs, leurs propriétés biologiques et technologiques ouvrent des perspectives intéressantes dans les domaines de la santé, de la pharmacie et de l'industrie (Grobben et *al*., 1998 ; Duboc & Mollet, 2001).

Ainsi, l'étude des exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques représente un axe de recherche important, permettant de mieux comprendre leurs mécanismes de synthèse ainsi que leurs applications potentielles.

1.2.1. Définition

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères glucidiques de haut poids moléculaire synthétisés par certains microorganismes et localisés à l'extérieur de la cellule. Ils peuvent être soit associés à la surface cellulaire sous forme de capsule, soit excrétés dans le milieu environnant sous forme soluble (Kranenburg et *al.*, 1999 ; Badel et *al.*, 2011).

Ces macromolécules sont constituées d'unités monosaccharidiques reliées entre elles par des liaisons glycosidiques, formant des structures linéaires ou ramifiées. Selon leur composition, les EPS peuvent être classés en homopolysaccharides, composés d'un seul type de sucre, ou en hétéropolysaccharides, constitués de plusieurs types de monosaccharides (Hames et *al*., 2006 ; Gorska et *al*., 2013).

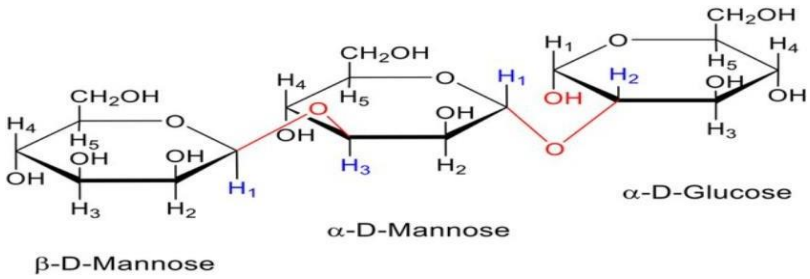


Figure 8: Structure de l'unité répétitive des EPS produits par *Lactobacillus spp*. (Tukenmez et *al*., 2019).

Chez les bactéries lactiques, les EPS représentent une catégorie importante de métabolites secondaires, impliqués dans diverses fonctions biologiques et technologiques, notamment dans l'amélioration des propriétés des produits fermentés (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Ruas-Madiedo et *al.*, 2005).

1.2.2. Biosynthèse des EPS

La biosynthèse des exopolysaccharides chez les bactéries lactiques est un processus complexe impliquant plusieurs étapes enzymatiques coordonnées. Elle débute par l'assimilation des sources de carbone, principalement les sucres, qui sont convertis en précurseurs activés sous forme de nucléotides-sucres. Ces intermédiaires jouent un rôle essentiel dans la formation des unités de base des polysaccharides (Kranenburg et *al.*, 1999).
Par la suite, ces unités sont assemblées de manière séquentielle par des enzymes spécifiques, notamment des glycosyltransférases, pour former des chaînes polysaccharidiques répétitives. Ce processus peut conduire à la formation de structures linéaires ou ramifiées, en fonction de la nature des enzymes impliquées et de l'organisation génétique des souches bactériennes.

Enfin, les polymères synthétisés sont exportés vers l'extérieur de la cellule à travers la membrane, soit sous forme liée à la surface cellulaire (capsule), soit sous forme libérée dans le milieu environnant. L'ensemble de ce processus est étroitement régulé par des gènes spécifiques dont l'expression dépend des conditions environnementales et nutritionnelles (Kranenburg et *al.*, 1999 ; De Vuyst et Degeest, 1999).

1.2.3. Production des EPS

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères extracellulaires synthétisés par certaines bactéries lactiques au cours de leur croissance, en particulier en présence de substrats carbonés fermentescibles tels que le glucose, le lactose ou le saccharose. Ces composés sont produits soit sous forme associée à la surface cellulaire, soit libérés dans le milieu environnant, en fonction des caractéristiques de la souche et des conditions de culture (De Vuyst & Degeest, 1999).
La production des EPS est influencée par de nombreux paramètres environnementaux et nutritionnels, notamment la composition du milieu de culture, la disponibilité en source de carbone, la température, le pH ainsi que la durée d'incubation. Parmi ces facteurs, la nature du sucre joue un rôle déterminant, certaines sources comme le saccharose favorisant fortement la synthèse des EPS (Cerning, 1990).

Par ailleurs, la production des EPS est généralement associée à la phase de croissance des bactéries, avec une synthèse plus importante observée durant la phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire. Cette production dépend également du potentiel génétique des souches, ce qui explique la variabilité observée entre différentes bactéries lactiques.

1.2.3.1. Facteurs influençant la production des EPS

La production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques est fortement influencée par plusieurs paramètres environnementaux et nutritionnels. Parmi ces facteurs, la nature de la source de carbone joue un rôle déterminant. En effet, certains sucres, comme le saccharose, sont particulièrement favorables à la synthèse des EPS, car ils servent de substrats directs pour certaines enzymes impliquées dans leur biosynthèse (Duboc & Mollet, 2001).

Le pH du milieu constitue également un facteur clé. Un environnement légèrement acide favorise généralement la production des EPS, bien que des variations importantes puissent exister selon les souches. De même, la température d'incubation influence à la fois la croissance bactérienne et l'activité enzymatique, ce qui impacte directement la quantité et la nature des polysaccharides produits.

D'autres paramètres, tels que la disponibilité en azote, la présence de sels minéraux et le stade de croissance des bactéries, interviennent également dans la régulation de la production des EPS. Enfin, il est important de souligner que la capacité de synthèse des EPS est spécifique à chaque souche, ce qui explique la variabilité observée entre différentes bactéries lactiques (Grobben et *al.*, 1998 ; Ruas-Madiedo et *al.*, 2005).

1.2.4. Méthodes de détection des EPS

La mise en évidence de la production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes qualitatives et quantitatives. Parmi les approches les plus simples, l'observation macroscopique des colonies sur des milieux de culture riches en sucres permet d'identifier des souches productrices d'EPS. Ces colonies présentent généralement un aspect visqueux, filant ou muqueux caractéristique.

L'utilisation de colorants spécifiques constitue également une méthode courante de détection. Par exemple, le rouge de ruthénium permet de visualiser les polysaccharides extracellulaires en se fixant sur leur structure, facilitant ainsi leur identification sur les milieux gélosés.

Des méthodes plus avancées peuvent être employées pour une caractérisation plus précise, telles que la précipitation des EPS à l'aide d'alcools, suivie d'une quantification, ou encore

l'utilisation de techniques analytiques comme la chromatographie. Ces approches permettent d'évaluer la quantité produite ainsi que la composition des exopolysaccharides (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Ruas-Madiedo et *al*., 2005).

1.2.5. Importance des EPS

D'un point de vue technologique, les EPS présentent un intérêt majeur dans l'industrie agroalimentaire, où ils sont utilisés comme agents texturants naturels améliorant la viscosité, la stabilité et les propriétés sensorielles des produits fermentés. Leur capacité de rétention d'eau permet de limiter la synérèse et d'optimiser la texture des aliments tels que les yaourts (Hassan et *al*., 1995 ; Duboc & Mollet, 2001).

En raison des restrictions croissantes concernant l'utilisation des additifs alimentaires, les EPS produits in situ par les bactéries lactiques constituent une alternative naturelle aux stabilisants d'origine chimique ou végétale. Leur utilisation permet de répondre à la demande des consommateurs de produits plus naturels et sans additifs (Grobben et *al*., 1998 ; Hutkins, 2006).

Par ailleurs, les EPS suscitent un intérêt croissant pour leurs effets potentiels sur la santé. Plusieurs études ont montré qu'ils peuvent exercer des activités biologiques telles que des effets postbiotiques, immunomodulateurs et anti-adhésifs vis-à-vis de certains microorganismes pathogènes (Ruas-Madiedo et *al*., 2005 ; Gorska et *al*., 2013).

Enfin, au-delà du secteur alimentaire, les EPS présentent des applications prometteuses dans les domaines pharmaceutique, médical et cosmétique, grâce à leurs propriétés de biocompatibilité, de viscosité et de formation de films, ce qui en fait des biomolécules d'intérêt industriel considérable (Badel et *al*., 2011).

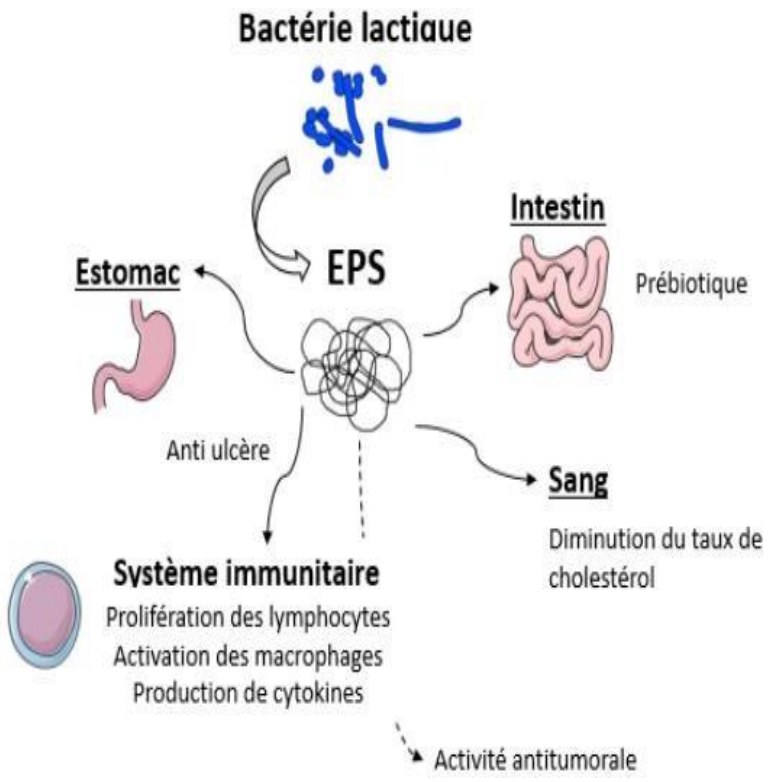


Figure 9 : Représentation schématique des effets bénéfiques possibles des EPS au niveau de l'organisme humain, d'après Sørensen *et al.* (2022).

2. Matériel et méthodes

2.1. Objectif de l'étude

Cette étude a pour objectif d'isoler et d'identifier des bactéries lactiques à partir d'échantillons de lait cru et de beurre traditionnels provenant de différentes régions de la wilaya de Relizane, puis d'évaluer leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS).

2.2. Lieu et période d'étude

Les travaux expérimentaux de cette étude ont été effectués au laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ahmed ZABANA de Relizane durant la période allant de février à mai 2026.

2.3. Echantillonnage

Les échantillons utilisés dans cette étude étaient constitués de lait cru et de beurre traditionnel collectés à partir de deux régions différentes de la wilaya de Relizane : Oued Rhiou et Sbaïa. Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions aseptiques puis transportés au laboratoire dans une glacière réfrigérée afin de préserver la qualité microbiologique des échantillons jusqu'à leur analyse.

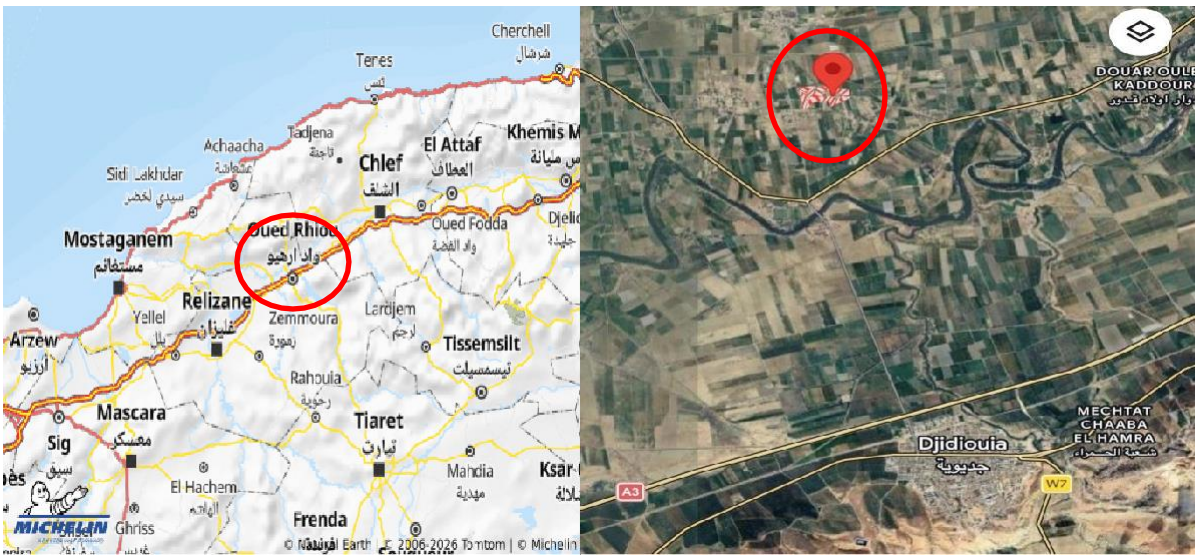


Figure 10: localisation des deux régions où les échantillons de lait et de beurre ont été prélevés **(Google Maps).**

2.4. Isolement et purification des souches

2.4.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Pour les échantillons de lait, 1 ml de chaque échantillon a été aseptiquement introduit dans 9 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir la solution mère. Concernant les échantillons de beurre, 1 g de chaque échantillon a été homogénéisé dans 9 ml d'eau physiologique stérile, selon les mêmes conditions. Des dilutions décimales successives ont ensuite été réalisées afin de réduire la charge microbienne et faciliter l'isolement des bactéries lactiques (Guiraud, 2003).



Figure 11: préparation des dilutions décimales.

2.4.2. Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques a été effectué sur le milieu De Man, Rogosa et Sharpe agar (MRS), considéré comme un milieu favorable à la croissance des bactéries lactiques (De Man et *al*., 1960). Un volume des dilutions obtenues a été ensemencé par étalement sur gélose MRS, puis les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, les colonies présentant des caractéristiques morphologiques différentes ont été sélectionnées.

2.4.3. Purification des isolats

Les colonies sélectionnées ont été repiquées plusieurs fois sur milieu MRS afin d'obtenir des cultures pures. Les isolats purifiés ont ensuite été conservés pour les analyses ultérieures.

2.4.4. Analyse des isolats

2.4.4.1. Examen macroscopique

L'analyse macroscopique des colonies isolées a été réalisée après incubation sur milieu De Man, Rogosa et Sharpe. Les caractéristiques morphologiques observées concernaient principalement la taille, la forme, la couleur, le relief ainsi que l'aspect des colonies.

2.4.4.2. Examen microscopique

L'examen microscopique des isolats a été effectué après coloration de Gram afin de déterminer la morphologie cellulaire et le caractère Gram des bactéries isolées. Les observations ont été réalisées au microscope optique à l'immersion. Les bactéries lactiques apparaissent généralement sous forme de coques ou de bacilles à Gram positif (Carr et *al.*, 2002).

2.4.4.3. Test de la catalase

Le test de la catalase a été réalisé en déposant une goutte d'eau oxygénée sur une colonie bactérienne fraîche. L'absence de dégagement gazeux a été considérée comme un résultat négatif caractéristique des bactéries lactiques, tandis que l'apparition de bulles indiquait une réaction positive (Guiraud, 2003).

2.4.5. Conservation des souches

Les souches bactériennes purifiées ont été conservées dans des tubes Eppendorf contenant le milieu de culture MRS, additionné de glycérol à 80 % afin d'assurer leur stabilité et leur viabilité. Les tubes ont été par la suite stockés au congélateur pour une conservation à long terme des isolats bactériens.



Figure 12: méthode de conservation des isolats bactériens dans un milieu de culture supplémenté en glycérol.

2.5. Identification des isolats

2.5.1. Identification biochimique par les galeries API 20 Strep

L'identification des souches bactériennes isolées a été réalisée à l'aide du système API 20 Strep, largement utilisé pour l'identification biochimique des bactéries à Gram positif, notamment les bactéries lactiques et les streptocoques. Cette méthode repose sur l'étude des caractéristiques métaboliques des souches à travers une série de microtests biochimiques miniaturisés permettant d'évaluer différentes activités enzymatiques et capacités fermentaires (Holt et *al*., 1994).

Les colonies bactériennes préalablement purifiées ont été mises en suspension dans une solution stérile conformément aux recommandations du fabricant. Les cupules de la galerie API 20 Strep ont ensuite été inoculées avec la suspension bactérienne, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, les réactions biochimiques observées ont été interprétées selon le changement de la couleur des différents tests. Les résultats obtenus ont permis d'établir un profil numérique spécifique à chaque souche bactérienne.

L'identification probable des isolats a été réalisée par comparaison des profils biochimiques obtenus avec les données de référence fournies par le système API 20 Strep. Cette technique constitue une méthode rapide et fiable pour l'identification des bactéries lactiques d'intérêt alimentaire et technologique (Carr et *al*., 2002 ; Axelsson, 2004).

2.6. Étude de la croissance

L'étude de la croissance des bactéries lactiques a été réalisée dans du lait écrème afin d'évaluer le développement des souches isolées au cours de l'incubation. Une première préculture a d'abord été réalisée dans le milieu MRS liquide, puis incubée à 37 °C pendant 18 heures afin d'obtenir des cellules bactériennes en phase active de croissance.

Après incubation, 200 µl de chaque préculture a été prélevée à l'aide d'une micropipette puis inoculée dans des tubes contenant du lait écrémé stérile (Candia Silhouette) . Les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, l'apparition d'une coagulation du lait a été considérée comme un indicateur de croissance bactérienne.

Par la suite, un volume de 1,5 ml de la culture obtenue a été transféré aseptiquement dans des flacons contenant 150 ml de lait écrémé stérile. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique (DO) au temps initial (T_0) après clarification du lait par une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) , afin de solubiliser les constituants du lait et faciliter les mesures spectrophotométriques. Les flacons ont été ensuite incubés au bain-marie à 30 °C pendant 24 heures. Après incubation, une seconde mesure de la densité optique a été réalisée au temps final (T_{24}) après addition d'EDTA dans les mêmes conditions. L'évolution des valeurs de la densité optique entre T_0 et T_{24} a permis d'évaluer la croissance des bactéries lactiques dans le lait.

2.7. Mise en évidence de la production des EPS

La mise en évidence de la production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lactiques repose généralement sur l'aspect visuel des colonies après culture sur des milieux spécifiques. La formation de colonies muqueuses ou filantes sur des milieux riches en sucres fermentescibles est généralement associée à cette propriété technologique (De Vuyst et Degeest, 1999).

2.7.1. Culture sur milieu MRS hypersaccharosé

Les souches bactériennes ont été ensemencées sur un milieu MRS préparé au laboratoire selon la composition décrite par De Man, Rogosa et Sharpe (1960), sans ajout de glucose, puis supplémenté en saccharose à une concentration finale de 20 %. Ce milieu hyper saccharosé favorise la synthèse des exopolysaccharides (EPS) par certaines bactéries lactiques (Cerning, 1990).

Après ensemencement, les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. L'apparition de colonies présentant un aspect visqueux, filant ou muqueux a été considérée comme un indicateur positif de la production d'exopolysaccharides.

2.7.2. Culture sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium

La mise en évidence de la production des EPS a également été réalisée sur milieu MRS agar supplémenté en rouge de ruthénium à une concentration de 0,08 g/L. Ce colorant est utilisé comme indicateur de la production des EPS, car il se fixe sur les polysaccharides et ne peut pas pénétrer le polymère d'EPS. Après 24 h d'incubation, les souches non productrices d'EPS présentent des colonies de couleur rouge puisqu'elles absorbent le colorant. Tandis que les colonies blanches ou roses pâles sur ce milieu indiquent souvent une production d'EPS. Cela s'explique par le fait que la couche de polymères entourant la bactérie empêche le colorant de se fixer à la paroi cellulaire (Stingele *et al*., 1996).

2.7.3. Test du "fil" (Ropiness)

Le test consiste à toucher une colonie avec une anse de platine. Si un filament visqueux de plusieurs millimètres se forme lors du retrait de l'anse, la souche est dite "filante" ou (ropey) (Knoshaug *et al*., 2000).

2.8. Dosage des exopolysaccharides (EPS)

Le dosage des exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries lactiques a été réalisé selon la méthode au phénol–acide sulfurique décrite par Dubois *et al.* (1956). Cette méthode colorimétrique est largement utilisée pour la quantification des glucides totaux grâce à la formation d'une coloration jaune-orangée mesurable au spectrophotomètre.

Avant le dosage, une étape d'extraction et de purification des EPS a été réalisée. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10 000 x g pendant 15 minutes afin d'éliminer les cellules bactériennes. Le surnageant récupéré a ensuite été mélangé à de l'éthanol froid à 96 % dans le but de précipiter les EPS. Après une incubation à 4 °C pendant une nuit, une seconde centrifugation a été effectuée afin de récupérer le culot correspondant aux EPS précipités. Le culot obtenu a ensuite été dissous dans de l'eau distillée chaude.

Pour le dosage, 1 ml de la solution d'EPS purifiée a été introduit dans un tube à essai auquel ont été ajoutés 1 ml de phénol à 5 % puis 5 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes ont été

laissés à température ambiante pendant 10 minutes puis placés au bain-marie à 30°C pendant 20 minutes afin de permettre le développement de la coloration.
L'absorbance des échantillons a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantification des EPS a été réalisée à partir d'une gamme étalon préparée avec différentes concentrations de glucose allant de 0 à 100 µg/ml. Les résultats ont été exprimés en équivalent glucose (Dubois et *al*., 1956 ; Cerning, 1990).

2.8.1. Préparation de la gamme étalon

Une solution mère de glucose a été préparée en dissolvant 100 mg de glucose pur dans 1 litre d'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de 100 mg/l. À partir de cette solution, plusieurs dilutions ont été réalisées pour obtenir différentes concentrations standards.
Chaque tube de la gamme étalon a subi le même traitement que les échantillons d'EPS, avec addition de phénol à 5 % et d'acide sulfurique concentré. Les absorbances obtenues ont permis de tracer une courbe d'étalonnage reliant l'absorbance à la concentration en glucose.

2.9. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, également appelée méthode des disques (Kirby-Bauer). Cette méthode permet d'évaluer le comportement des bactéries vis-à-vis de différents antibiotiques à travers l'observation des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'antibiotiques (Ammor et *al*., 2007).
Les souches bactériennes préalablement purifiées ont été ensemencées à la surface du milieu gélosé de manière homogène à l'aide d'un écouvillon stérile. Des disques d'antibiotiques ont ensuite été déposés aseptiquement à la surface du milieu. Les antibiotiques testés étaient la tétracycline (TE), l'érythromycine (E), la ceftazidime (CAZ) et l'Ampicilline (AM).
Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition observées autour des disques ont été mesurés afin de déterminer la sensibilité ou la résistance des souches étudiées.
Une zone d'inhibition importante traduisait une sensibilité à l'antibiotique, tandis qu'une absence ou une faible zone d'inhibition indiquait une résistance bactérienne.
Cette analyse a permis d'établir le profil de sensibilité des bactéries lactiques isolées et d'évaluer leur sécurité microbiologique pour une éventuelle utilisation technologique ou probiotique (Mathur et Singh, 2005 ; EFSA, 2012).

3. Résultats et discussions

3.1. Isolement des bactéries lactiques

3.1.1. Caractéristiques macroscopiques

Sept souches de bactéries lactiques ont été isolées dans notre étude, sur milieu MRS solide. L'examen macroscopique a permis de décrire l'aspect des colonies de ces souches qui apparaissent de petite taille, de forme circulaire, lisses, opaques, à contour régulier et de couleur blanchâtre à crème, comme présenté dans la figure ci-dessous **(figure 13).**

Certaines souches présentaient un aspect visqueux ou muqueux, suggérant une capacité potentielle de production d'exopolysaccharides (EPS).

Ces caractéristiques macroscopiques sont généralement décrites chez les bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers fermentés (Carr et *al.*, 2002 ; Axelsson, 2004).

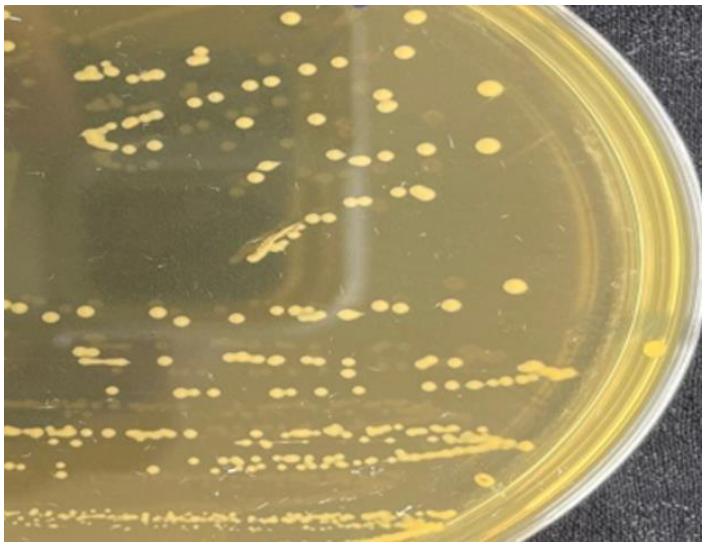


Figure 13: aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu MRS.

3.1.2. Caractéristiques microscopiques

L'examen microscopique après coloration de Gram a montré que les souches isolées étaient constituées de bactéries à Gram positif (apparaissent de couleur violette sous microscope optique). Les cellules observées présentaient des formes variées, notamment des coques et des coccobacilles disposés isolément, en paires ou en chaînes courtes **(figure 14)**.

Ces résultats correspondent aux caractéristiques généralement rapportées pour les bactéries lactiques, connues pour être des microorganismes Gram positifs non sporulés (Guiraud et Joseph, 1998).

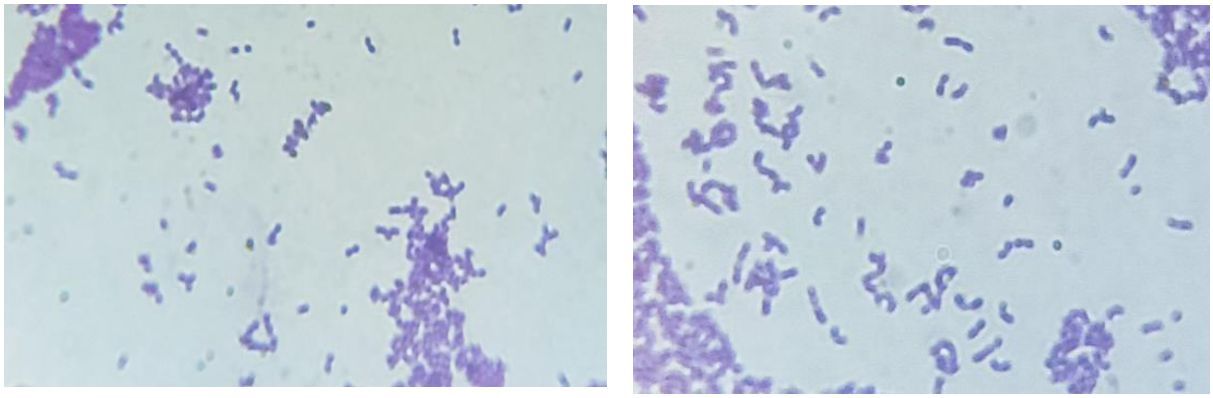


Figure 14: observation microscopique des souches après coloration de Gram, au grossissement (G 10 x100)

3.1.3. Test de la catalase

Le test de la catalase réalisé sur les sept souches isolées a révélé une absence de production de bulles de gaz après addition d'eau oxygénée, indiquant une réaction catalase négative. Ce résultat constitue l'une des caractéristiques biochimiques principales des bactéries lactiques.

L'absence de l'activité de la catalase chez les bactéries lactiques est liée à leur métabolisme fermentaire et à leur incapacité à dégrader le peroxyde d'hydrogène par absence de cette enzyme (Axelsson, 2004).

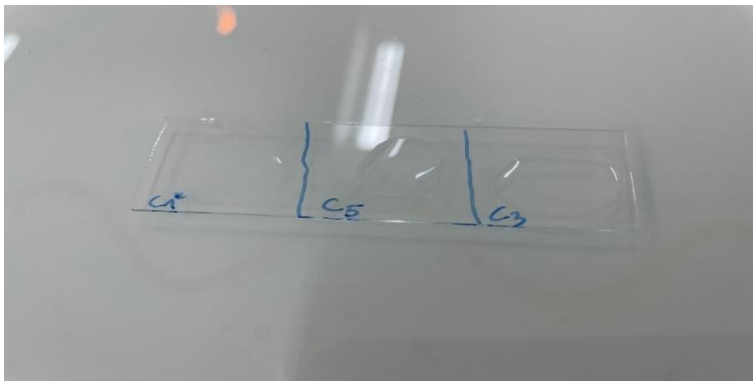


Figure 15: résultat du test de la catalase.

Les résultats relatifs aux examens : macroscopique et microscopique et au test de la catalase confirment l'appartenance des sept souches au groupe des bactéries lactiques.

3.2. Identification des souches

L'identification des souches isolées a été réalisée à l'aide de la galerie API 20 Strep et du logiciel API web database (API Strept V7.0, bioMérieux). Cette méthode repose sur l'étude des profils biochimiques obtenus après lecture des différentes réactions enzymatiques et fermentaires de chaque souche.

Les résultats de l'identification ont permis de rattacher les sept souches isolées, aux genres suivants présentés dans **le tableau 3** :

Tableau 2: identification biochimique des sept souches isolées.

Souches (codes)	L'identification
VR1	*Leuconostoc sp*
VR2	*Leuconostoc sp*
BR1	*Leuconostoc sp*
VS1	*Leuconostoc sp*
VS2	*Lactococcus lactis ssp lactis*
BS1	*Aerococcus viridans*
BS2	*Leuconostoc sp*

L'analyse des résultats obtenus au moyen des galeries API a permis d'établir les profils métaboliques des sept souches présentées dans **le tableau 3**:

Tableau 3: profils biochimiques des souches identifiées par la galerie API 20 Strep.

Souches / Tests	VR1	VR2	BR1	VS1	VS2	BS1	BS2
VP	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	+	-	-
RIB	-	-	-	-	+	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	+	-	-
TRE	-	+	+	-	+	+	-
INU	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-
AMD	-	-	-	-	-	-	-

(+) : Réaction positif (-) : Réaction négative

VP : Vogues-Proskauer ; **ESC** : Esculine ; **ADH** : Arginine dihydrolase ; **RIB** : D-Ribose ; **ARA** : L-Arabinose; **MAN** : D- Mannitol; **SOR**: D-Sorbitol; **LAC**: D- Lactose (origine bovine); **TRE**: D-Tréhalose; **INU**: Inuline; **RAF**: D-Raffinose; **AMD**: Amidon.

Les souches VR1, VR2, BR1, VS1 et BS2 ont été identifiées comme appartenant au genre *Leuconostoc*. Les profils biochimiques obtenus à l'aide de la galerie API 20 Strep ont montré plusieurs caractères compatibles avec ce genre, notamment la positivité du test Voges-Proskauer (VP) et l'absence d'hydrolyse de l'arginine (ADH). Les différences observées dans la fermentation de certains glucides reflètent la diversité métabolique existant entre les espèces du genre *Leuconostoc*.

Les bactéries du genre *Leuconostoc* sont des coques (sphériques ou ovoïdes), à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques hétérofermentaires. Elles produisent principalement de l'acide lactique, mais également du dioxyde de carbone et divers composés aromatiques à partir de la fermentation des sucres. Cette caractéristique les distingue de plusieurs autres bactéries lactiques homofermentaires. Leur présence est fréquemment rapportée dans le lait cru, les produits laitiers fermentés ainsi que dans différents aliments traditionnels fermentés.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont également reconnues pour leur intérêt technologique, notamment leur capacité à synthétiser des exopolysaccharides à partir du saccharose. Ces polymères contribuent à l'amélioration de la texture, de la viscosité et de la stabilité de nombreux produits alimentaires. Cette propriété est particulièrement importante dans le contexte de la présente étude consacrée à l'évaluation du potentiel producteur d'EPS des souches isolées.

Ainsi, l'identification majoritaire des isolats comme appartenant au genre *Leuconostoc* suggère un potentiel technologique élevé et justifie l'intérêt porté à ces souches dans les essais de croissance, de production d'exopolysaccharides et de caractérisation fonctionnelle réalisés au cours de ce travail.

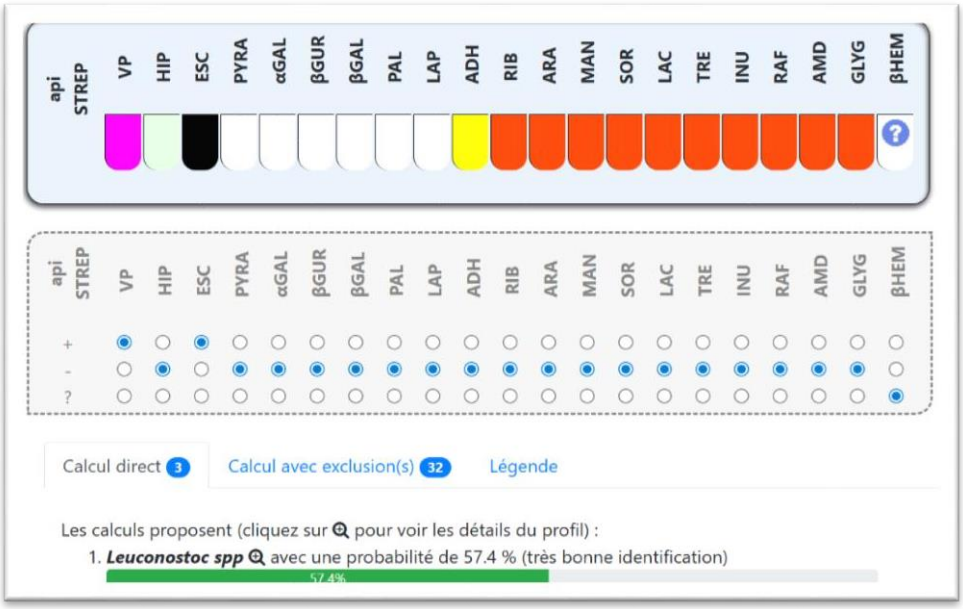


Figure 16: Profil fermentaire de la souche **VR1,** rattachée au genre *Leuconostoc sp*

La souche VS2 a été identifiée comme *Lactococcus lactis ssp lactis* sur la base de son profil biochimique obtenu par la galerie API 20 Strep. Cette espèce est l'une des bactéries lactiques les plus importantes dans l'industrie agroalimentaire, particulièrement dans le domaine laitier. Son profil métabolique est caractérisé par une forte aptitude à fermenter les glucides et à produire rapidement de l'acide lactique.

Lactococcus lactis est une bactérie homofermentaire dont le métabolisme conduit principalement à la formation d'acide lactique à partir du lactose. Cette activité provoque l'acidification du milieu, favorisant la coagulation du lait et limitant le développement des microorganismes indésirables. Pour cette raison, cette espèce est largement utilisée comme levain dans la fabrication des fromages, des laits fermentés et d'autres produits laitiers.

La présence de cette souche parmi les isolats étudiés présente un intérêt particulier, car les souches de *Lactococcus lactis* sont également connues pour produire différentes substances bioactives, notamment des bactériocines et, dans certains cas, des exopolysaccharides contribuant à l'amélioration des propriétés rhéologiques des aliments fermentés.

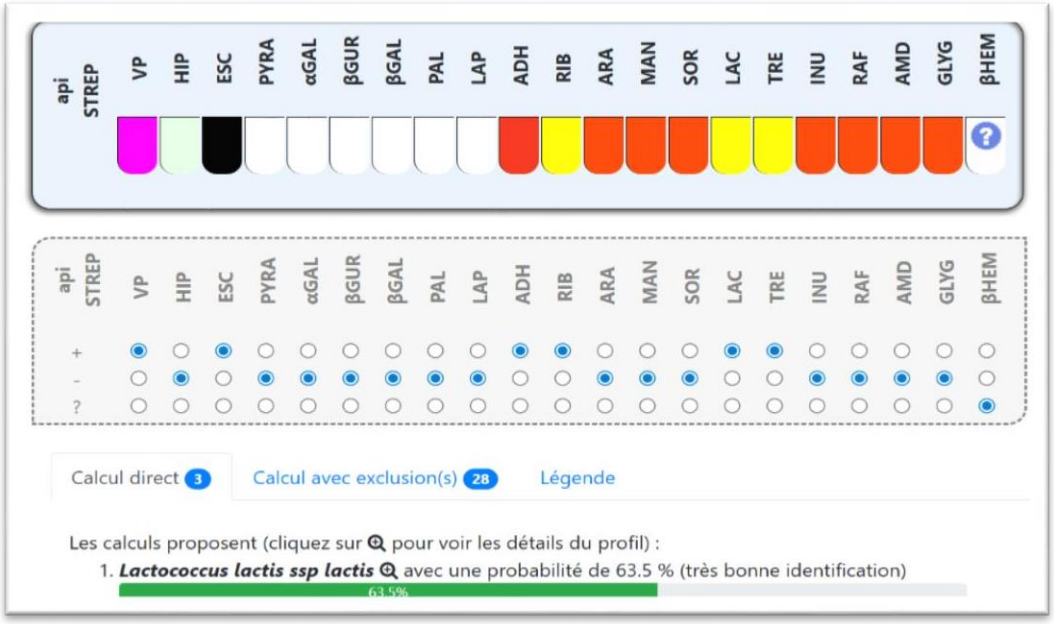


Figure 17: Profil fermentaire de la souche VS2 identifiée comme *Lactococcus lactis ssp. lactis.*

La souche BS1 a été identifiée comme *Aerococcus viridans*, comme présenté dans la **figure 18.**

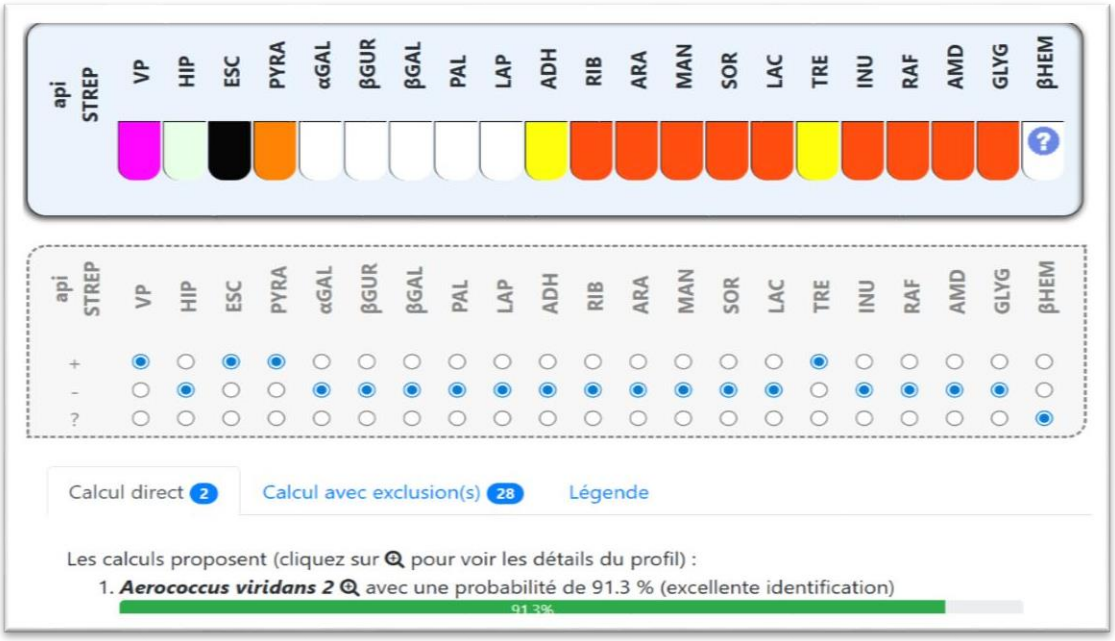


Figure 18: Profil fermentaire de la souche BS1, identifiée comme *Aerococcus viridans.*

La souche *Aerococcus viridans* a été écartée de la suite des travaux expérimentaux. Cette décision a été prise en raison de son faible intérêt pour l'objectif principal de l'étude, à savoir la production des EPS.

Ainsi, les expérimentations ultérieures ont été poursuivies sur les six autres souches présentant le meilleur potentiel pour cette activité.

3.3 Caractérisation technologique des souches

3.3.1 Première préculture des souches

Après incubation dans le milieu MRS bouillon à 37 °C pendant 18 heures, l'ensemble des souches ont présenté un trouble du milieu traduisant une croissance bactérienne active. Cette turbidité indique la capacité des souches à se développer dans le milieu nutritif utilisé.

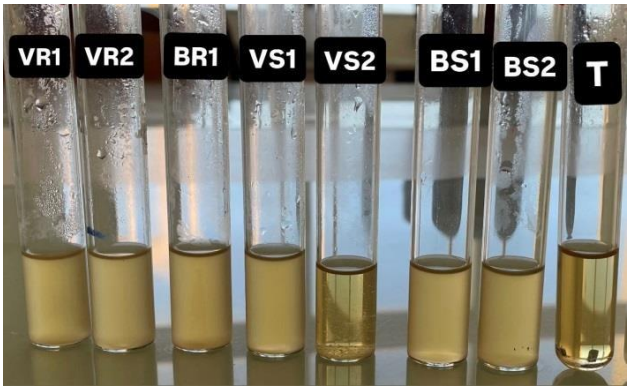


Figure 19: première préculture des souches réalisée sur milieu MRS.

3.3.2 Deuxième préculture des souches

Après incubation des souches dans le lait pendant 24 heures à 37 °C, une coagulation du lait a été observée, traduisant leur aptitude à fermenter le lactose et à produire de l'acide lactique.

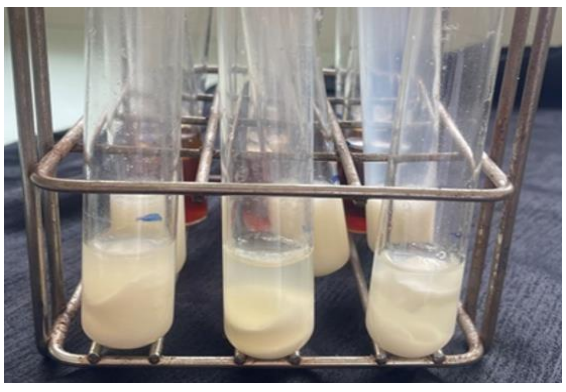


Figure 20: deuxième préculture des souches réalisée sur milieu lait écrémé.

3.3.3 Étude de la croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne constitue une étape importante dans la caractérisation technologique des bactéries lactiques. Elle permet d'évaluer la capacité des souches isolées à se développer dans le lait ainsi que leur activité métabolique au cours de l'incubation.

Dans cette étude, la croissance des différentes souches a été suivie par la mesure de la densité optique (DO) à deux temps d'incubation, T_0 et T_{24}. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et la figure suivants.

Tableau 4: évolution de la densité optique des souches étudiées entre T_0 et T_{24}.

Souches	DO à T_0	DO à T_{24}
VR1	0.029	0.080
VR2	0.006	0.054
BR1	0.023	0.079
VS1	0.007	0.183
VS2	0.016	0.076
BS2	0.001	0.191

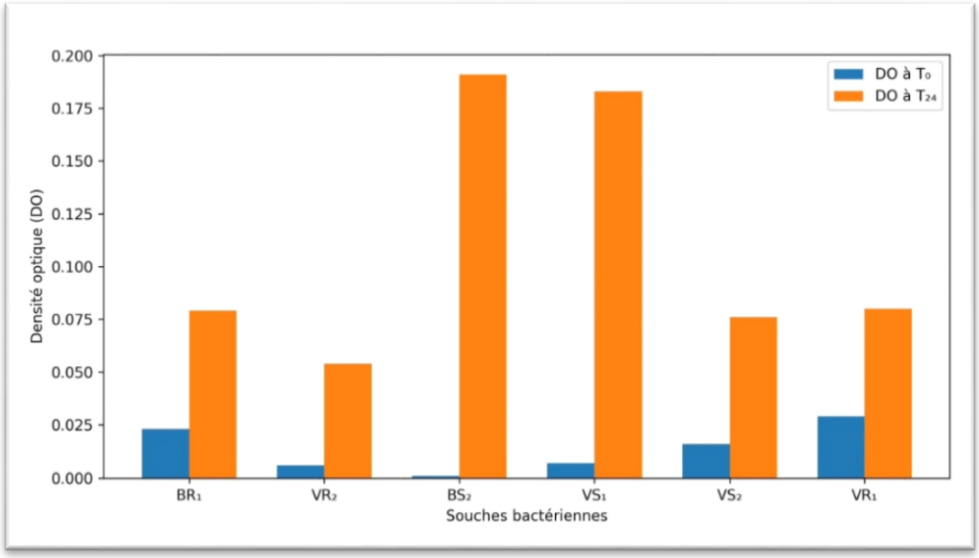


Figure 21: évolution de la densité optique des souches lactiques entre T_0 et T_{24}.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la croissance des six souches dans le lait ont montré une augmentation de la densité optique entre le temps initial (T_0) et après 24 heures d'incubation (T_{24}), comme présenté dans la figure 21. Cette évolution traduit une multiplication cellulaire

progressive des bactéries ainsi qu'une bonne adaptation au milieu de culture utilisé. En effet, les bactéries lactiques sont capables d'utiliser les nutriments présents dans le lait, notamment le lactose, afin d'assurer leur développement et leur activité métabolique.

Au début de l'incubation, les valeurs de la densité optique enregistrées à T_0 étaient faibles pour toutes les souches, ce qui correspond à une faible concentration cellulaire initiale. Après 24 heures d'incubation à 30 °C, une augmentation notable de la DO a été observée chez toutes les souches, témoignant d'une activité biologique importante et d'une prolifération bactérienne active.

Parmi les souches étudiées, les deux souches de *Leuconostoc sp* (BS2) et (VS1) ont présenté les valeurs les plus élevées avec des densités optiques respectives de 0,191 et 0,183. Ces résultats indiquent une forte capacité de croissance et une meilleure aptitude à exploiter les substrats nutritifs présents dans le lait.

Les souches de *Leuconstoc sp* (BR1, VS2 et VR1) ont également montré une croissance appréciable, bien que les valeurs enregistrées soient légèrement inférieures à celles des souches précédentes. En revanche, la souche de *Lactococcus lactis* (VR2) a présenté la valeur de DO la plus faible après incubation (0,054), suggérant une activité de croissance plus limitée dans les mêmes conditions expérimentales. Les différences observées entre les souches peuvent être attribuées à la diversité de leurs propriétés biochimiques et métaboliques, notamment leur vitesse de multiplication et leur capacité d'adaptation au milieu laitier.

D'une manière générale, l'augmentation des valeurs de densité optique après incubation confirme la viabilité des souches lactiques étudiées ainsi que leur capacité à se développer dans le lait. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études rapportant que les bactéries lactiques possèdent une forte aptitude de croissance dans les milieux riches en nutriments grâce à leur activité fermentaire et à leur production de métabolites d'intérêt technologique (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004 ; Axelsson, 2004).

3.3.4. Culture sur milieu MRS hypersaccharosé

Les six souches de bactéries lactiques étudiées ont été ensemencées sur un milieu MRS hyper saccharosé afin d'évaluer leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS). Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures, toutes les souches ont présenté des colonies à aspect visqueux et filant. Cette apparence macroscopique constitue un indicateur important de la synthèse des EPS par les bactéries lactiques.



Figure 22: Aspect des colonies sur milieu MRS hyper saccharosé.

3.3.5. Culture sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium

La capacité des souches à produire des exopolysaccharides a également été étudiée sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium. Ce colorant est utilisé comme indicateur de la production d'EPS, car il interagit avec les polysaccharides extracellulaires produits par les bactéries.

Après incubation, les souches étudiées ont présenté des colonies blanches. Cela s'explique par le fait qu'elles ont pu produire des EPS et la couche de polymère exopolysaccharidique entourant la bactérie a empêché le colorant de se fixer à la paroi cellulaire. De plus, la présence d'un halo clair autour de la colonie signifie une production d'EPS diffusibles (qui ne restent pas collés à la cellule mais se propagent dans la gélose). C'est un excellent indicateur pour les souches utilisées en industrie laitière pour la texture.

Ces observations sont en accord avec les travaux de Cerning (1990), qui a montré que certaines bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides peuvent présenter des intensités de coloration variables sur milieu contenant le rouge de ruthénium, en fonction de la nature et de la quantité des EPS synthétisés.



Figure 23: Aspect des colonies sur milieu MRS additionné au rouge de ruthénium.

3.3.6. Test du ropiness

L'observation d'un filament visqueux lors du prélèvement des colonies à l'aide d'une anse de platine traduit la production de substances polymériques extracellulaires. Ces composés sont sécrétés par certaines bactéries lactiques en présence d'une forte concentration en saccharose, utilisée comme source carbonée favorable à la biosynthèse des exopolysaccharides.



Figure 24: aspect filant des souches bactériennes lactiques sur milieu hyper saccharosé.

Les résultats obtenus montrent donc que l'ensemble des souches isolées possède un potentiel technologique intéressant pour la production d'EPS. Cette propriété est particulièrement recherchée dans l'industrie agroalimentaire en raison de son rôle dans l'amélioration de la texture, de la viscosité et de la stabilité des produits fermentés. Des observations similaires ont été rapportées par plusieurs auteurs ayant montré que les milieux riches en saccharose favorisent fortement la production des exopolysaccharides chez les bactéries lactiques (De Vuyst et Degeest, 1999).

3.3.7. Dosage des exopolysaccharides (EPS)

Le dosage des exopolysaccharides produits par les souches étudiées a été réalisé selon la méthode au phénol–acide sulfurique. Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de différentes concentrations de glucose standard afin de déterminer la relation entre la concentration et la densité optique (DO).

Les résultats obtenus ont permis de tracer une droite d'étalonnage représentée par l'équation suivante : **y = 0,0117x - 0,004** où **y** est la **DO** et **x** : la concentration des EPS en mg/l, avec un coefficient de corrélation : $R^2 = 0,9858$.

La valeur élevée du coefficient de corrélation indique une bonne linéarité entre les concentrations standards et les valeurs de la densité optique mesurées. Les concentrations des EPS produits par les différentes souches ont ensuite été déterminées à partir de cette équation.

Tableau 5: concentration standards et valeurs de la densité optique de la gamme étalon.

Concentration de glucose (mg/l)	DO
0	**0**
20	**0.178**
40	**0.49**
60	**0.715**
80	**1.004**
100	**1.096**

Tableau 6: valeurs de la densité optique et de la concentration des EPS produites par les souches étudiées.

Souches	DO	Concentration des EPS (mg/l)
BR1	**1.11**	**62.93785311**
VR2	**1.44**	**123.4188034**
BS2	**1.34**	**114.8717949**
VS1	**1.37**	**117.4358974**
VS2	**0.95**	**81.53846154**
VR1	**1.46**	**125.1282051**

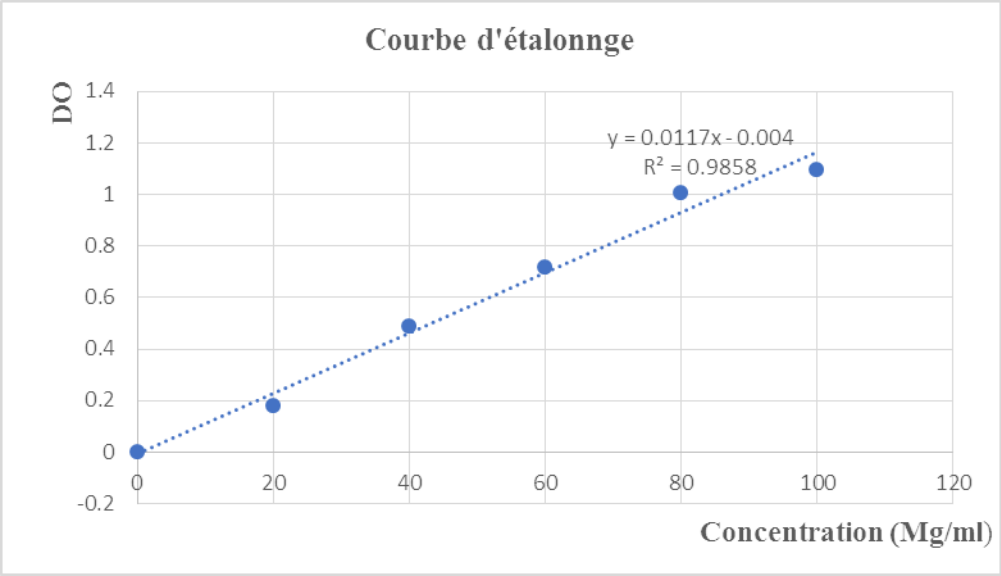


Figure 25: Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des concentrations des EPS, pour les six souches

Les résultats du dosage ont mis en évidence la capacité de l'ensemble des souches étudiées à produire des EPS, bien que des différences quantitatives aient été observées entre elles. Cette variabilité peut être attribuée aux caractéristiques génétiques et physiologiques propres à chaque souche ainsi qu'à son aptitude à utiliser les substrats carbonés disponibles dans le milieu de culture. Selon De Vuyst et Degeest (1999), la production des EPS dépend fortement du potentiel métabolique de la souche et des conditions environnementales dans lesquelles elle a été cultivée.

Les concentrations obtenues confirment les observations réalisées sur le milieu hyper saccharosé, où toutes les souches ont présenté un aspect filant et visqueux. Cette corrélation entre les observations macroscopiques et les résultats du dosage suggère une synthèse effective des exopolysaccharides par les bactéries isolées. La production de ces polymères extracellulaires est généralement associée à la présence de sucres fermentescibles, notamment le saccharose, qui favorise leur biosynthèse chez plusieurs bactéries lactiques.

D'un point de vue technologique, les EPS jouent un rôle important dans l'amélioration des propriétés rhéologiques des produits fermentés. Ils contribuent à l'augmentation de la viscosité, à l'amélioration de la texture, à la rétention d'eau et à la stabilité des aliments. Ces caractéristiques expliquent l'intérêt croissant porté aux bactéries lactiques productrices d'EPS dans les secteurs agroalimentaire et biotechnologique (Ruas-Madiedo et *al.*, 2002).

Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence le potentiel des souches isolées comme productrices d'EPS et soulignent leur intérêt pour de futures applications dans les produits fermentés à valeur ajoutée.

3.3.8. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme ont montré une absence ou une très faible zone d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés, notamment la tétracycline (TE), l'érythromycine (E), la ceftazidime (CAZ) et l'ampicilline (AM). Ces observations traduisent une faible sensibilité, voire une résistance des souches bactériennes étudiées aux antibiotiques utilisés.

Les profils de résistance observés peuvent être attribués à plusieurs facteurs. D'une part, certaines résistances sont intrinsèques, liées à la nature de la bactérie et aux caractéristiques propres des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. D'autre part, des variations inter-souches peuvent résulter des mécanismes génétiques spécifiques tels que l'acquisition des gènes de résistance ou la présence de plasmide.

Par ailleurs, la production des EPS pourrait contribuer à une protection supplémentaire contre certains antibiotiques en constituant une barrière extracellulaire limitant leur pénétration et réduisant ainsi leur efficacité ; comme décrit dans les travaux de De Vuyst et Degeest (1999). Les EPS jouent également un rôle important dans la formation de biofilms, ce qui augmente la tolérance bactérienne face aux conditions défavorables et aux substances inhibitrices (Ruas-Madiedo et *al*., 2002). Toutefois cette protection est généralement considérée comme un mécanisme de tolérance plutôt que comme une résistance génétique proprement dite.

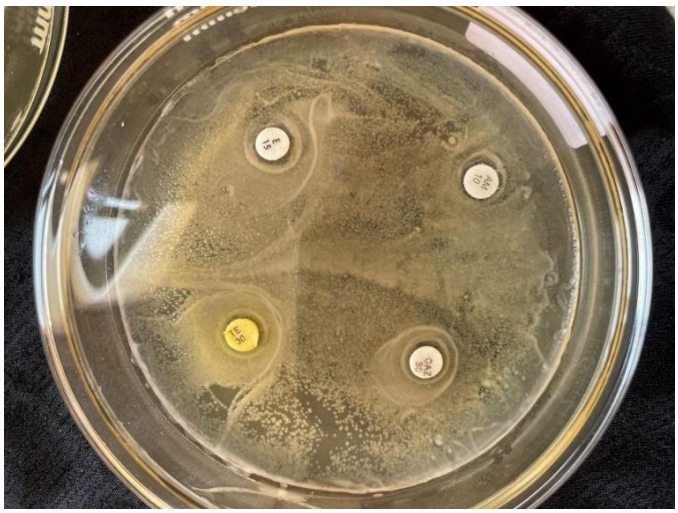


Figure 26: Exemple du résultat de l'antibiogramme de la souche de *Leconostoc sp* vis-à-vis des antibiotiques testés.

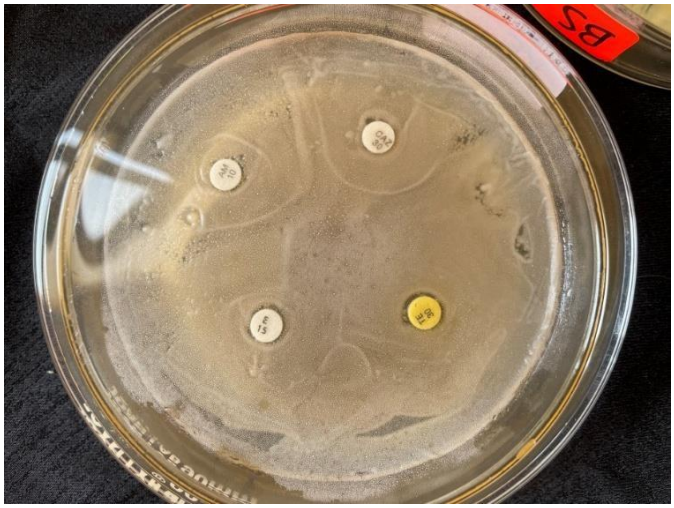


Figure 27: exemple du résultat de l'antibiogramme de la souche de *Lactococcus lactis* vis-à-vis des antibiotiques testés.

Bien que nos souches aient présenté des résistances aux antibiotiques testés, limitant potentiellement leur utilisation directe comme ferments industriels vivants, elles demeurent d'un grand intérêt biotechnologique pour la production d'exopolysaccharides. En effet, les EPS sont des métabolites extracellulaires pouvant être récupérés facilement à partir du surnageant de culture après élimination des cellules bactériennes. De plus, leur utilisation sous forme purifiée permet de s'affranchir des risques liés à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques tout en conservant leurs propriétés biologiques (activité immunomodulatrice, anti-oxydante, prébiotique et texturante). Ainsi ces polymères représentent des candidats prometteurs pour des applications en tant que postbiotiques ou ingrédients fonctionnels (on désigne par postbiotique tout composé bioactif libéré par un microorganisme et qui peut exercer un effet bénéfique sur la santé sans nécessiter la présence de la cellule microbienne vivante).

4. Conclusion

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans l'industrie agroalimentaire grâce à leurs nombreuses propriétés technologiques et fonctionnelles. Elles interviennent dans la fermentation de divers produits alimentaires et contribuent à l'amélioration de leurs caractéristiques organoleptiques, notamment la texture, l'arôme, la saveur et la conservation. Certaines souches présentent également la capacité de produire des exopolysaccharides (EPS), des biopolymères d'intérêt croissant pour leurs applications technologiques et leurs effets bénéfiques potentiels.

À travers cette étude, nous avons contribué à l'isolement, l'identification et la caractérisation technologique de bactéries lactiques provenant du lait de vache et du beurre. Après les étapes d'isolement, de purification et de caractérisation morphologique, physiologique et biochimique, l'identification réalisée à l'aide de la galerie API 20 Strep a permis de rattacher les souches étudiées principalement au genre *Leuconostoc* (VR1, VR2, BR1, VS1 et BS2), ainsi qu'aux espèces *Lactococcus lactis* (VS2) et *Aerococcus viridans* (BS1).

Les essais de caractérisation technologique ont montré que l'ensemble des souches possède une aptitude à se développer dans le lait, avec des niveaux de croissance variables selon les isolats. Les résultats obtenus sur milieu hyper saccharosé ont révélé un aspect visqueux et filamenteux chez toutes les souches étudiées, suggérant leur capacité à produire des exopolysaccharides. Cette aptitude a été confirmée par les essais réalisés sur milieu contenant le rouge de ruthénium ainsi que par le dosage des EPS, qui a mis en évidence des quantités variables selon les souches. L'étude de l'antibiorésistance a montré une faible sensibilité vis-à-vis des antibiotiques testés. Cette observation pourrait être associée à l'effet protecteur exercé par les exopolysaccharides produits autour des cellules bactériennes, bien que des investigations complémentaires soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel technologique des bactéries lactiques isolées. Ces souches constituent une source intéressante de microorganismes producteurs d'exopolysaccharides pouvant être valorisés dans le domaine agroalimentaire. Des travaux complémentaires portant sur la caractérisation structurale des EPS produits et l'évaluation de leurs propriétés biologiques permettraient de mieux apprécier leurs perspectives d'application dans les secteurs alimentaire et biotechnologique.

5. Références bibliographiques

A

• **Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007).** Antibiotic resistance in non-entering and non-starter lactic acid bacteria associated with fermented foods: The phenotype and the genotype. *Food Microbiology*, *24*(3), 198–203.

• **Atlan, D., Béal, C., Champonier-Vergès, M. C., Chapot-Chartier, M. P., Chouayekh, H., Cocaign-Bousquet, M., … Yvon, M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In G. Corrieu & F.-M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments* (pp. 271–447). Tec & Doc, Lavoisier.

• **Augustin, J. C. (2005).** Modélisation de la croissance des bactéries. In *Microbiologie* prévisionnelle. Lavoisier.

• **Axelsson, L. (2004).** Classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3rd ed., pp. 1–66). Marcel Dekker.

B

• **Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011).** New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances,* *29*(1), 54–66.

• **Baliarda, A. (2003).** Caractérisation de résistances aux stress chez les bactéries lactiques. *Thèse de Doctorat,* Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

• **Béal, C., Foucaud-Scheunemann, C., & Corrieu, G. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In G. Corrieu & F.-M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments* (pp. 661–765). Tec & Doc, Lavoisier.

• **Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018).** Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science, 101*(4), 3611–3629. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345

• **Bouton, Y. (1992).** Contribution à l'étude des bactéries lactiques. *Thèse de doctorat,* Université de Franche-Comté.

Buchanan, R. E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *Journal of Infectious Diseases, 23*(2), 109–125.

C

• **Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999).** Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1–2), 131–149.

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

• **Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2008).** Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, *76*(2), 295–307.

• **Cerning, J. (1990).** Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *7*(1–2), 113–130.

• **Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2017).** Isolation and characterization of lipase and protease from Lactobacillus fermentum. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 68–73.

• **Corrieu, G., & Luquet, F.-M. (Eds.). (2008).** *Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments.* Tec & Doc, Lavoisier.

D

• **De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, *23*(1), 130–135.

• **De Roissart, H. (1986).** Bactéries lactiques. In H. de Roissart & F.-M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques* (Vol. 1, pp. 25–116). Lorica.

• **De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999).** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*(2), 153–177.

• **Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999**). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*(1–4), 159–184.

• **Devriese, L. A., Pot, B., & Collins, M. D. (1993).** Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, *75*(4), 399–408.

• **Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie*

Société et Environnement, 13(1), 143–154.

• **DesStingele, F., Neeser, J. R., & Mollet, B. (1996).** Identification and characterization of the exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from Streptococcus thermophilus Sfi6. *Journal of Bacteriology, 178*(6), 1680-1690.

• **Duboc, P., & Mollet, B. (2001).** Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal, 11*(9), 759–768.

• **Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956**). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry, 28*(3), 350–356.

E

• **EFSA (European Food Safety Authority). (2012).** Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal, 10*(6), 2740.

F

• **Farag, M. A., Jomaa, S. A., El-Wahed, A. A., & El-Seedi, H. R. (2020).** The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients,* 12(2), 346.

• **Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., & Poli, A. (2014).** Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Marine Drugs, 12*(5), 3005–3024.

• **Franz, C. M., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. (1998).** Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology, 47*(1–2), 1–24.

G

• **Gevers, D. (2002).** Genotypic characterization and antibiotic resistance of lactic acid bacteria. *PhD Thesis,* Ghent University, Belgium.

• **Gorska, S., Schwarzer, M., Jachymek, W., Srutkova, D., Brzozowska, E., Kozakova, H., & Gamian, A. (2013).** Distinct immunomodulation of bone marrow-derived dendritic cell responses to Lactobacillus plantarum WCFS1 by two different polysaccharides isolated from

Lactobacillus rhamnosus LOCK 0900. *Applied and Environmental Microbiology, 79*(18), 6899–6906.

• **Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J., & de Bont, J. A. M. (1998).** Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar nucleotide metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus NCFB 2772. *Applied Microbiology and Biotechnology, 46*(3), 279–284.

• **Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013).** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology, 4*, 202.

• Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie alimentaire (2e éd.). Dunod.

• Guiraud, J. P., & Joseph, R. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod.

H

• **Hames, C., Doğan, N., & Özçelik, S. (2006).** Exopolysaccharide production by Lactobacillus strains isolated from traditional cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22*(3), 261–265.

• **Hassan, A. N., Frank, J. F., & Qvist, K. B. (1995).** Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science, 78*(12), 2629–2636.

• **Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004).** Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional food. *International Dairy Journal, 14*(6), 467–494.

• **Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2007).** Yeasts are necessary for co-fermentation with lactic acid bacteria to achieve yogurt-like product. *Food Microbiology*, 24, 796–801.

• **Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition, 73*(2), 365S–373S.

• **Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Williams & Wilkins.

• **Hutkins, R. W. (2006).** *Microbiology and Technology of Fermented Foods.* Blackwell Publishing.

K

• **Khue, N. M., & Ngoc, T. T. B. (2013).** Characterization of exopolysaccharides produced by

lactic acid bacteria isolated from fermented milk products in Vietnam. *African Journal of Biotechnology, 10*(72), 16232–16239.

• **Knoshaug, E. P., Ahlgren, J. A., & Trempy, J. E. (2000).** Growth associated exopolysaccharide expression in Lactococcus lactis subsp. cremoris RAPY3. *Letters in Applied Microbiology, 30*(2), 166–171.

• **Kranenburg, R. V., Marugg, J. D., van Swam, I. I., Willem, N. J., & de Vos, W. M. (1999).** Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in Lactococcus lactis. *Molecular Microbiology, 24*(2), 387–397.

L

• **Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology, 15*(2), 67–78.

• **Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993).** *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Tec & Doc, Lavoisier.

• **Leveau, J. Y., Bouix, M., & De Roissart, H. (1991).** Flores microbiennes des aliments. In *Microbiologie industrielle*. Tec & Doc, Lavoisier.

• **Liu, M., Nauta, A., Francke, C., & Siezen, R. J. (2014).** Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy.* Wiley-Blackwell.

• **Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2010).** Biodiversity and applications of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice.* Springer.

M

• **Mathur, S., & Singh, R. (2005).** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology, 105*(3), 281–295.

• **Menigjin, X., Songa, J., & Nakai, H. (2010).** Protease systems of lactic acid bacteria: current status and future perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74,* 898–905.

• **Messens, W., & De Vuyst, L. (2002).** Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs — a review. *International Journal of Food Microbiology, 72*(1–2), 31–43.

• **Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M., & Geenen, I. (1997).** The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. *Food Chemistry, 59*(4), 539–545.

• **Monnet, C., Beal, C., & Corrieu, G. (2008).** L'activité protéolytique des bactéries lactiques.

In G. Corrieu & F.-M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments.* Tec & Doc, Lavoisier.

• **Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Vicosa, G. N., & Nero, L. A. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT – Food Science and Technology, 43*(9), 1320–1324.

• **Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006).** Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated Lactobacillus reuteri. *International Journal of Food Microbiology, 111*(2), 164–169.

O

• **Orla-Jensen, S. (1919).** *The Lactic Acid Bacteria.* Host & Son.

P

• **Pasteur, L. (1857).** Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 45*, 913–916.

• Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2010). *Microbiologie* (3e éd. française). De Boeck Université.

R

• **Rogers, A. H., et al. (2006).** *Molecular Oral Microbiology.* Caister Academic Press.

• **Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005).** Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science, 88*(3), 843–856.

• **Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal, 12*(2–3), 163–171.

S

• **Salvucci, E., LeBlanc, J. G., & Pérez, G. (2016).** Technological properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from naturally fermented sausages. *LWT – Food Science and Technology, 68*, 288–294.

• **Sørensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., &**

Freeland, B. (2022). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients*, 14(14), 2938.

• **Stingele, F., Neeser, J. R., & Mollet, B. (1996).** Identification and characterization of the exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from Streptococcus thermophilus Sfi6. *Journal of Bacteriology*, *178*(6), 1680–1690.

• **Sutra, L., Federighi, M., & Jouve, J. L. (1998).** *Manuel de bactériologie alimentaire.* Polytechnica.

T

• **Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., & Luzzi, I. (2006).** Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in five European countries and the contribution of enterococci to their microbiological safety. *International Journal of Food Microbiology*, *107*(3), 344–353.

• **Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., & Swings, J. (2003).** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(1), 1–10.

• **Thierry, A., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Dalmasso, M., Cousin, F. J., & Jan, G. (2017).** New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. *International Journal of Food Microbiology*, *149*(1), 19–27.

• **Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & Yavuz, S. (2019).** The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Scientific Reports*, *9*, 8268.

U

• **Ummugulsum Tukenmez, Busra Aktas, Belma Aslim, Serkan Yavuz. (2019).**The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro.*Scientific Reports*.9:8268.

V

• **Vescovo, M., Scolari, G., & Zacconi, C. (1996).** Inhibition of Listeria innocua growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, 13(3), 395–399.

• **Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P., & Panya, A. (2006).** Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of nham

inoculated with different inoculum levels of Lactobacillus curvatus. *LWT – Food Science and Technology*, *39*(8), 814–826.

W

• **Wallace, R. J., Cotta, M. A., & Forsberg, C. W. (2003**). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (2nd ed.). Blackie Academic & Professional.

Z

• **Zhang, Z., & Cai, Y. (2014).** Characterization of enterococci isolated from traditional fermented dairy products. *Journal of Food Protection, 77*(3), 427–433.

6. Annexes

Annexe 1 : Les milieux de culture

- Eau physiologique

Chlorure de sodium..... 9 g.

Eau distillée stérile..... 1000 ml.

Après l'agitation répartir dans des tubes à essai à raison de 9 ml par tube.

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

C'est une solution isotonique, qui permet de préserver le volume cellulaire.

-Milieu MRS (DE MAN, ROGOZA, SHARPE, 1960)

Composition en g/l

Peptone.....10

Extrait de levure 8

Extrait de viande..... 4

Acétate de sodium 5

Phosphate bipotassique 2

Citrate d'ammonium..... 2

Sulfate de magnésium, ... 0.2

Sulfate de manganèse,.....0.05

Glucose 20

Tween 80.....1ml

Agar 15

Eau distillée qsp. .....1000 ml

pH =5,4

-Lait écrémé

Nous avons utilisé dans de notre travail du lait écrémé commercialisé par la firme Candia, sous le nom de Silhouette, il s'agit d'un lait stérilisé à ultra-haute température (UHT). Ce milieu a été conçu pour la culture des bactéries.

Annexe 2 : la coloration de Gram

-Réalisation du frottis bactérien

1. Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile.
2. Prélever une colonie pure de la culture bactérienne et déposer sur la goutte d'eau
3. Faire un étalement de la colonie avec l'anse de platine ou une pipette stérile de façon à obtenir un étalement de 1 à 2 cm.
4. Sécher et fixer par passage rapide la lame, au-dessus de la flamme du bec Bunsen.

-Coloration de Gram

1. Déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis préparé, laisser agir 60 secondes.
2. Après rinçage, couvrir de Lugol qui est un fixateur pendant 30 sec.
3. Décolorer rapidement le frottis avec de l'alcool.
4. Rincer avec l'eau distillée.
5. Recolorer avec la fuschine pendant 1 min.
6. Rincer à l'eau distillée pendant 10 sec.

Déposer, par la suite, une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré et observer au microscope optique à l'objectif (G X 100).
Les cellules Gram positives absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent violettes en apparence, tandis que les cellules Gram négatives apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 3 : Galerie API 20Strep

- **Tableau de la lecture de la galerie API 20strep**

api® 20 Strep — 07625K - fr - 2009/12

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3) Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
				4 h	24 h	4 h	24 h
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse ß-glucosidase (ESCuline)	Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-ß-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclairement intense Incolore ou Orange très pâle		Orange	
αGAL	6-bromo-2-naphtyl-αD-galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Violet	
ßGUR	acide naphtol-ASBI-glucuronique	0,0537	ß-GlUcuRonidase	Incolore		Bleu	
ßGAL	2-naphtyl-ßD-galactopyranoside	0,0306	ß-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-ß-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
RIB	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
ARA	L-arabinose	1,4	acidification (ARAbinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
SOR	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
TRE	D-trèhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
INU	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
RAF	D-raffinose	3,12	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
AMD	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.
(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.
(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION p. II
BIBLIOGRAPHIE p. III
TABLE DES SYMBOLES p. IV

BIOMERIEUX, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.
CLSI est une marque appartenant à Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.
ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

BIOMÉRIEUX

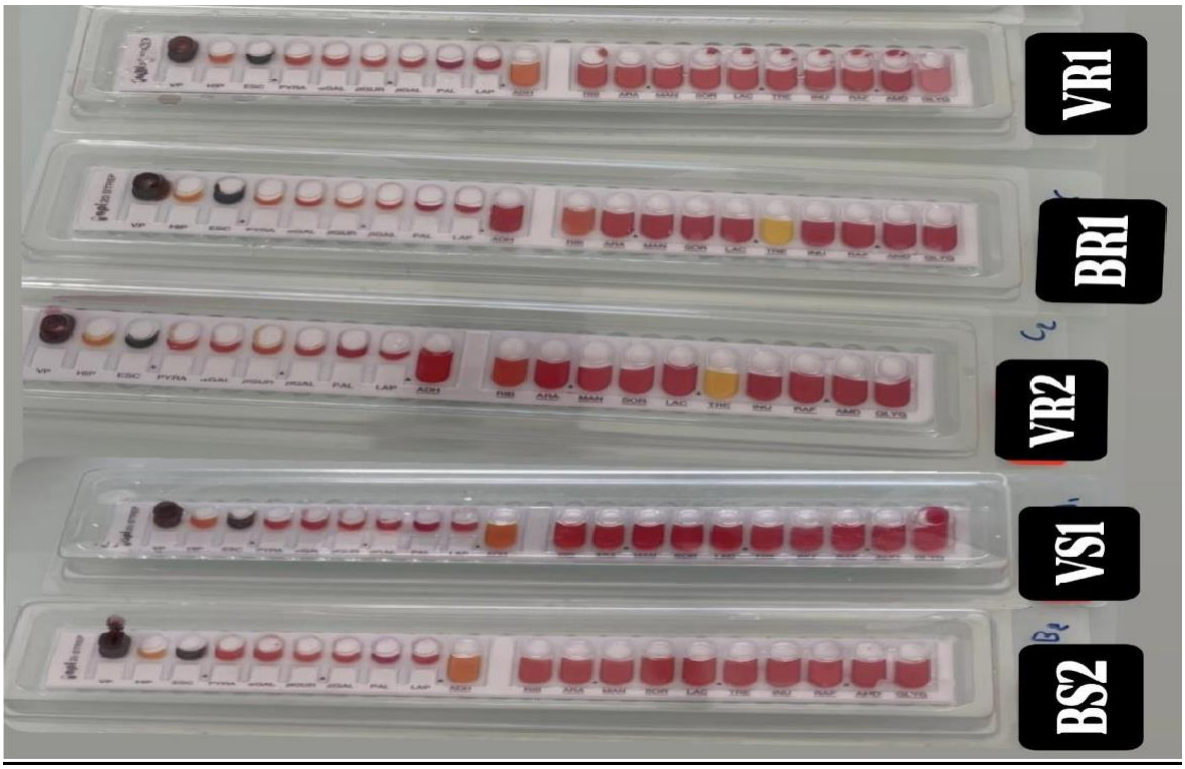
bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
Imprimé en France

CE

- **Photographie des galeries API 20 Strep**

-Galerie API 20 Strep des souches du genre *Leuconostoc sp.*



-Galerie API 20 Strep de la souche *Lactococcus lactis ssp lactis.*



-Galerie API 20 Strep de la souche *Aerococcus viridans.*

