



MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

[Click here to enter a date.](#)

Belaghlem Nada

Absi Oumaima

Iselement et étude de la diversité génétique par les marqueure moléculaires RAPD-PCR de quelques souches de bactéries lactiques du lait de chèvre de la région de Biskra

Jury:

M.	Zeroual Samir	MCA	Univ Mohamed Khider de Biskra	président
Ms.	Chekara Mohammed Bouziani	MMA	Univ Mohamed Khider de Biskra	Rapporteur
MMe.	Ben Harzallah Naouel	MCA	Univ Mohamed Khider de Biskra	Examineuse

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements

Nous tenons tous d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et Miséricordieux qui de nos avoir donné la volonté, la patience durant toutes nos Années d'étude, et le courage de réaliser cet humble travail. Qui nos permis de Voir ce jour tant attendu. Et nous remercie nos parents d'être à nos côtés et de Croire en nous.

Nos remerciements vont particulièrement à :

Notre encadreur, CHEKARA BOUZIANI MOHAMMED, pour nous avoir Encadrés et suivis et toutes les corrections qu'il a apportés à ce travail nous Avons eu un grand plaisir à travailler sous votre direction. Je remercie pour Nous avoir donné l'opportunité de faire ce travail.

DRIDI OUALID, nous remercions pour son aide et sa gentillesse.

Nous tenons à remercier les membres du Jury à leur tête le président de Jury et l'examineur pour avoir accepté de juger le présent mémoire.

Enfin, à tout ce qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce Travail, profondes estimations et nous demandons à Dieu tout-puissant que nous Avons réussi à préparer ce message, et que Dieu nous aide et nous accorde le Success.

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à mon père et à ma mère.

À mes frères : Miloud et Shams al-Din

À mes sœurs : Olaya et Rufaida

Un grand merci aux propriétaires des chèvres qui ont accepté de m'offrir un peu de leur précieux temps pour la réalisation des enquêtes et pour avoir des échantillons du lait pour la réalisation des analyses.

Je suis profondément reconnaissante à toutes et à tous ceux qui ont su se mobiliser autour de mon travail, et m'apporter non seulement leur expertise technique, mais aussi leur temps et leurs conseils avisés, contribuant ainsi à la qualité de mon travail et de ma formation.

Oumaima

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à mon père et à ma mère.

À mes frères Abdo et lakhdar

À mes sœurs : Hadil

Un grand merci aux propriétaires des chèvres qui ont accepté de m'offrir un peu de leur précieux temps pour la réalisation des enquêtes et pour avoir des échantillons du lait pour la réalisation des analyses.

Je suis profondément reconnaissante à toutes et à tous ceux qui ont su se mobiliser autour de mon travail, et m'apporter non seulement leur expertise technique, mais aussi leur temps et leurs conseils avisés, contribuant ainsi à la qualité de mon travail et de ma formation.

Hind Fatima Mofida Omaima Kalthom Zahra Fatima

Nada

Table des matières

Remerciements	
Success	
Dédicace	
Dédicace	
Table des matières	I
Liste des Tableaux	III
Liste des Figures	IV
Liste des abréviations	V
Introduction générale	1
Partie I	
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1	3
Les races caprines	3
Chapitre 1. Les races caprines	4
I- Races caprine, Lait de chèvre et bactérie lactiques	4
1.1. . Principales races caprines en Algérie	4
1.1. La race Arabia	4
1.2. La race Kabyle	4
1.3. La race Makatia	4
1.4. La race M'Zab	5
2. Lait de chèvre	5
2.1. Importance du lait de chèvre	6
2.2. Composition et Caractéristiques du Lait de Chèvre	7
2.2.1. Eau	7
2.3. Caractéristiques Physico-chimiques	10
2.4. Microbiologie du lait	11
2. Bactéries lactiques	13
2.1. Habitat	14
2.2. Classification et typage	14
2.3. Principaux genres des bactéries lactiques	16
II. La diversité génétique par les marqueurs moléculaires	17
1. Notion des marqueurs moléculaires	17
2. Types des marqueurs moléculaires	18

2.1. Amplified Fragment Length Polymorphism (RFLP)	18
2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	18
2.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)	20
2.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	21
Partie II. Expérimentale	23
Chapitre 2. Matériels et méthodes	11
1. Échantillonnage et collecte du lait	11
2. Methodologies	11
1.1. Isolement des Bactéries Lactiques	12
1.2. Purification des Isolats	13
1.3. Identification des isolats	13
Étude du polymorphisme génétique des isolats caséinolytiques par RAPD-PCR	17
Chapitre 3. Résultats et discussion	Erreur ! Signet non défini.
1. Isolement des bactéries lactiques	Erreur ! Signet non défini.
2. Identification des bactéries lactiques	Erreur ! Signet non défini.
3. Purification	Erreur ! Signet non défini.
4. Étude du polymorphisme génétique des souches par RAPD-PCR	Erreur ! Signet non défini.
Discussion:	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion	16
Références bibliographiques	43
Annexe 1	41
Résumés	54
Résumés	43

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition moyenne du Lait de Chéver (St-Gelais et al., 2000).	7
Tableau 2. Composition minérale du lait (Jeant et al., 2007).	8
Tableau 3. Concentration en vitamines du lait de chèvre (FAO, 2002).	9
Tableau 4. Les principales constantes physico-chimiques du lait de chèvre (FAO, 1990).	10
Tableau 5. La flore originale du lait (Guiraud, 2003).	12
Tableau 6. La flore de contamination du lait (Gyuiraud, 2003).	13
Tableau 7. Information sur les échantillons de lait collectés.	11
Tableau 8. Amorces RAPD Testées.	19
Tableau 9. fdgg	20
Tableau 10. Condition d'amplification de la RAPD-PCR avec l'amorce M13 selon (Giraffa et al., 2000).	20
Tableau 11. Les étapes d'amplification pour l'amorce 1254 selon (Akopyanz et al., 1992).	20
Tableau 12. Concentration et la pureté de l'ADN génomique.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 13. Taux de polymorphisme.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 14. Diagramme types des souches avec l'amorce M13.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 15. Taux de polymorphisme.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 16. Diagrammes types des souches avec l'amorce 1254.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 17. Matrice finale des 2 amorces.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 18. Pourcentage du polymorphisme généré par les 2 amorces. .	Erreur ! Signet non défini.

Liste des Figures

Figure 1. Arbre phylogénique basé sur la comparaison du gène de l'ARN 16S, montrant les relations entre les bactéries lactiques à faible pourcentage GC et les germes à Gram positif à haut pourcentage GC du genre <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propianibacterium</i> (Holzapfel et al., 2001).	15
Figure 2. Méthodologie d'étude.	12
Figure 3. Isolement et purification des bactéries lactique.	14
Figure 4. Dosage de l'ADN par Nanodrop.	19
Figure 5. Amorces utilisées pour RAPD-PCR.	19
Figure 6. Programmation du Thermocycleur.	21
Figure 7. Séparation des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agrose.	22
Figure 8. Révélation par le système Doc-Print, VX2.	22
Figure 9. Le lait cru a été utilisé grâce à la technique de Rateau.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 10. Aspect de colonies purifiées sur gélose MRS. Figure 11. Cultures des souches sur milieu MRS.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 12. Observation microscopique des isolats lactiques sur gélose MRS. X100.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 13. Résultat négative du test catalase sur gélose MRS.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 14. Profil électrophorétique RAPD-PCR avec l'amorce M13.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 15. Profil électrophorétique RAPD-PCR avec l'amorce 1254.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 16. Dendrogramme RAPD-PCR M13,1254.	Erreur ! Signet non défini.

Liste des abréviations

- **ADN:** Acide désoxyribonucléique.
- **AFLP:** Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés.
- **ATP:** Adénosine triphosphate.
- **BL:** bactéries lactiques.
- **C ° :** Degré Celsius.
- **CO₂ :** Dioxyde de carbone.
- **DNTP:** Désoxyribonucléotides Triphosphate.
- **DO :** Densité Optique.
- **EDTA:** Ethylène Diamine Tétracétique Acid.
- **G+C :** Guanine + Cytosine
- **HCl :** Acide chlorhydrique.
- **IRS :** Insulin Receptor Substrate.
- **ISSR :** Inter Simple Sequence Repeat.
- **MgCl₂ :** Chlorure de Magnésium.
- **MRS:** Man Rogosa et Sharpe.
- **Pb:** paire de base
- **PCR:** polymerase chain reaction.
- **PFGE:** Pulsed Field Gel Electrophoresis
- **pH:** potentiel Hydrogène.
- **PK:** Protéinase K.
- **QSP:** Quantité suffisante pour.
- **RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA.
- **Rpm:** Rotation par minute.
- **SDS:** Sodium dodécyl sulfate.
- **SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate- PolyACrylamide Gel Electrophorèsis.
- **TBE:** Tris Borate EDTA

Introduction générale

Introduction générale

Le lait de chèvre présente de nombreux avantages pour la santé humaine. Il serait préférable de le consommer davantage, car il présente les mêmes propriétés nutritionnelles que le lait de femmes. Il se distingue des autres espèces en raison de sa composition riche en protéines, lipides et glucides, qui sont des nutriments essentiels. Bien qu'il contienne une quantité significative de vitamines A, D, C et B, le lait de chèvre présente également une plus grande richesse en minéraux et oligo-éléments, notamment en phosphore, potassium, calcium et magnésium (**St-Gelais et al., 1999**). Un écosystème microbien complexe est constitué par plusieurs micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) présents dans le lait de chèvre.

Selon (**Ouadghiri, 2009**). Plusieurs micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) sont présentés dans le lait de chèvre forment ainsi un écosystème microbien complexe. Parmi ces micro-organismes sont les bactéries lactiques qui participent de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés.

Le rôle des bactéries lactiques est important pour notre santé, car elles forment une grande partie de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, ce qui nous protège contre l'invasion des germes pathogènes. (**Belarbi, 2011**). Ils sont couramment utilisés dans l'alimentation animale, les industries pharmaceutiques, les industries alimentaires et principalement dans l'industrie laitière (laits fermentés, yaourts, fromages frais et affinés). Leurs avantages résident dans leur capacité à impacter la qualité finale des produits. Ces caractéristiques incluent les caractéristiques suivantes: l'acidification, l'aromathérapie, les propriétés enzymatiques, la lipolyse et l'activité protéolytique et peptidasique (**Casaburi et al., 2007**).

La caractérisation des souches présentant des propriétés technologiques intéressantes, l'identification des bactéries lactiques et la caractérisation des souches probiotiques et productrices de bactériocines sont des sujets de recherche qui exigent des méthodes d'identification fiables, en particulier celle des souches de bactéries lactiques à l'intérieur de l'espèce. La variabilité génétique des bactéries lactiques est étudiée en utilisant des méthodes de typage phénotypique (électrophorèse) et moléculaires telles que RAPD PCR, AFLP, PFGE, IRS,

ISSR. Le typage des souches joue un rôle important car il permet de recenser les souches autochtones et de constituer des bases de données de souches de bactéries lactiques (**Ghazi, 2014**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des bactéries lactiques et étudie leur diversité génétique par les marqueurs moléculaires RAPD-PCR. L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de MOHAMMED KHIDER BISKRA durant la période April- juin de l'année 2024.

Partie I.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1.

Les races caprines

Chapitre 1. Les races caprines

I- Races caprine, Lait de chèvre et bactérie lactiques

1.1. . Principales races caprines en Algérie

Selon Dahmani et Chebabha (2015), la population caprine en Algérie présente une grande diversité, comprenant des animaux de races locales et importées, ainsi que des populations croisées. En se basant sur les travaux de Feliachi et al. (2003), la population caprine en Algérie peut être divisée en quatre catégories principales : Arabia, Makatia, Naine de Kabylie et Chèvre du M'Zab.

1.1. La race Arabia

Il s'agit de la race la plus dominante. Elle se rencontre sur les plateaux supérieurs, dans les régions steppiques et semi-steppiques. Sa taille varie de 50 à 70 cm, sa tête est couverte de cornes, et ses oreilles sont longues et pendantes. Elle présente des couleurs noires, grises et marron, avec des poils longs de 12 à 15 cm. Selon Bey et Laloui (2005), la production laitière moyenne de la chèvre arabe est de 1,5 litre par jour.

1.2. La race Kabyle

C'est une chèvre autochtone qui peuple les massifs montagneux de la Kabylie et des Aurès. Elle est robuste, massive et de petite taille, d'où son nom "Naine de Kabylie". Sa tête se distingue par ses longues oreilles tombantes, et sa robe est à poils longs et de couleur variée (noire, blanche ou brune). L'effectif total est d'environ 427 000 têtes, avec 307 000 femelles reproductrices et 23 500 mâles utilisés pour la reproduction. Sa production laitière est faible ; elle est principalement élevée pour sa viande, appréciée pour sa qualité (Bey et Laloui, 2005).

1.3. La race Makatia

Cette race est localisée dans les hauts plateaux de la région nord de l'Algérie et est principalement utilisée pour la production de lait, de viande, de peau et de cuir. Elle est de grande taille et de couleur variée (Abdelguerfi, 2003). La chèvre Makatia est probablement le résultat du croisement entre la Charkia et l'Arbia à poils longs, et elle est originaire de la région d'Ouled Nail

(Tazi, 2001). Selon Belmihoub (1997), cette chèvre est élevée dans la région de Laghouat en association avec la chèvre Arbia en élevage sédentaire. La chèvre Makatia présente une hauteur moyenne de 70 cm, un corps allongé, des cornes dirigées vers l'arrière ou parfois absentes, des oreilles longues et tombantes, et une robe de plusieurs couleurs (grise, beige, blanche et brune).

1.4. La race M'Zab

Également connue sous le nom de "chèvre rouge des oasis", cette race est originaire de Metliliou Berriane. Son corps est allongé, droit et rectiligne, mesurant 68 cm pour le mâle et 65 cm pour la femelle, avec des poids respectifs de 50 kg et 35 kg. Les couleurs de la robe sont le chamois, le brun et le noir. La plupart des individus ont un poil court (3-7 cm), une tête mince avec des cornes rejetées en arrière lorsqu'elles sont présentes. Les oreilles sont longues (15 cm) et tombantes (Bey et Laloui, 2005).

2. Lait de chèvre

Le lait de chèvre se distingue par ses propriétés nutritionnelles et ses caractéristiques organoleptiques uniques. La matière grasse du lait de chèvre est une émulsion de globules gras dispersés dans une solution aqueuse (sérum) qui contient divers éléments, certains dissous (lactose, protéines du lactosérum, etc.), et d'autres sous forme colloïdale (caséines). Selon Doyon (2005), le lait de chèvre est considéré comme l'un des aliments les plus complets et les mieux équilibrés parmi tous les aliments disponibles.

Le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache en raison de l'absence de carotène, ce qui lui donne une couleur distincte. Il présente également une saveur légèrement sucrée. Selon Zeller (2005), le lait de chèvre se distingue par une saveur spécifique et un goût plus prononcé que le lait de vache. Ces caractéristiques sont dues à la composition unique des acides gras et des composés volatils présents dans le lait de chèvre.

En plus de ses qualités gustatives, le lait de chèvre est une source riche de nutriments essentiels tels que les vitamines A, B2 (riboflavine), et D, ainsi que des minéraux comme le calcium, le magnésium et le potassium. Ces nutriments sont facilement assimilables, ce qui rend le lait de chèvre particulièrement bénéfique pour les personnes ayant des besoins nutritionnels spécifiques, comme les enfants en bas âge et les personnes âgées (Haenlein, 2004).

Des études récentes ont également montré que le lait de chèvre a des propriétés hypoallergéniques, ce qui signifie qu'il est moins susceptible de provoquer des réactions allergiques par rapport au lait de vache. Cela est principalement dû à la structure différente de ses protéines, notamment les caséines (Park, Juárez, Ramos, & Haenlein, 2007).

Le lait de chèvre contient également des oligosaccharides, similaires à ceux trouvés dans le lait humain, qui agissent comme prébiotiques et favorisent la santé intestinale en stimulant la croissance de bactéries bénéfiques (Ceballos *et al.*, 2009).

2.1. Importance du lait de chèvre

Il existe différents types de lait selon les espèces de mammifères, et le lait de chèvre peut être une option avantageuse en remplacement du lait de vache (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Les produits à base de lait de chèvre attirent de plus en plus l'attention des consommateurs pour diverses raisons :

1. **Consommation domestique** : La chèvre est souvent considérée comme la "vache du pauvre" dans de nombreuses régions du monde, en raison de sa capacité à produire du lait dans des conditions où d'autres animaux d'élevage ne pourraient pas survivre.
2. **Produits dérivés appréciés** : Les produits à base de lait de chèvre, notamment le fromage et le yaourt, sont très appréciés pour leur goût distinct et leur texture crémeuse. Ce goût unique est attribué à la composition particulière des acides gras et des composés volatils présents dans le lait de chèvre (Park *et al.*, 2007).
3. **Propriétés nutritionnelles et hypoallergéniques** : Le lait de chèvre est connu pour ses propriétés nutritionnelles spécifiques, telles que la présence de vitamines A, B2 (riboflavine), D, ainsi que des minéraux comme le calcium, le magnésium et le potassium. Il est également moins susceptible de provoquer des réactions allergiques par rapport au lait de vache, ce qui le rend populaire parmi les personnes souffrant d'allergies au lait de vache (Haenlein, 2004a).

Le lait de chèvre joue un rôle crucial à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays en développement où il contribue de manière significative à l'alimentation humaine. Les protéines, les graisses, les glucides, les sels minéraux et d'autres composants du lait de chèvre sont bien

équilibrés, ce qui influence sa qualité nutritionnelle et sa valeur comme matière première pour la production alimentaire (Wehrmueller *et al.*, 2008).

2.2. Composition et Caractéristiques du Lait de Chèvre

Le lait de chèvre se présente comme un liquide blanc et opaque, avec une saveur particulière liée à sa composition en certains acides gras spécifiques tels que l'acide caproïque, caprylique et caprique (Penseur & Toussaint, 1995; St-Gelais *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2003). La couleur blanche caractéristique du lait de chèvre est due à l'absence de carotène, un pigment naturel présent dans le lait d'autres femelles laitières d'élevage (Penseur & Toussaint, 1995; Mathieu, 1998).

Selon Favier (1985), le lait de chèvre est une source importante de protéines de haute qualité, riches en acides aminés essentiels, en particulier la lysine, essentielle à la croissance. Les lipides du lait de chèvre sont caractérisés par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, riches en acides gras saturés et insaturés, véhiculant ainsi des quantités importantes de cholestérol et de vitamine A, ainsi que de faibles quantités de vitamines D et E.

Tableau 1. Composition moyenne du Lait de Chéver (St-Gelais *et al.*, 2000).

Composition.	%
Eau	87,1
Matière sèche totale	12,9
Matière grasses	4,1
Matière azotées	3,5
Lactose	4,5
Minéraux	0,8

2.2.1. Eau

L'eau constitue la principale composante du lait, étant polaire, elle permet de créer des solutions réelles avec des composés polaires et des solutions colloïdales avec des protéines

hydrophiles. Les matières grasses, non polaires, forment des émulsions d'huile dans l'eau, tandis que les micelles de caséine restent en suspension colloïdale (Amiot et al., 2002).

2.2.2. Matière Grasse

La matière grasse du lait de chèvre est l'une des principales sources d'énergie, avec une quantité totale de lipides d'environ 4 % (Kongo et al., 2016b). Les lipides incluent des acides gras, des triacylglycérols, et des phospholipides, tels que le cholestérol, la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, les glycolipides et les glycoprotéines membranaires. Les acides gras saturés et insaturés varient selon l'espèce (Jeantet et al., 2018), et le lait de chèvre est notamment faible en acides gras polyinsaturés (Guétouache et al., 2014). La matière grasse laitière est résistante à l'oxydation grâce à la présence naturelle d'antioxydants et d'acides gras saturés, bien que l'oxydation puisse être induite par la présence de métaux comme le cuivre ou l'exposition à la lumière (Renhe et al., 2019).

2.2.3. Lactose

Le lactose est le sucre particulier du lait, composé d'un galactose et d'un glucose liés par une liaison osidique β (1-4). Le lactose agit comme prébiotique en favorisant les bifidobactéries et les Lactobacilles (Roberfroid, 2001). Les oligosaccharides présents dans le lait de chèvre (250-300 mg/l) ont des propriétés anti-inflammatoires intéressantes (Martinez-Ferez *et al.*, 2006; Daddaoua *et al.*, 2006).

2.2.4. Composition minérale

Bien que la fraction minérale soit faible, elle est cruciale sur le plan structural, nutritionnel et technologique. Le lait et ses dérivés sont les principales sources de calcium et de phosphore dans l'alimentation (Jeantet *et al.*, 2007). Les minéraux clés incluent le calcium, le magnésium, le sodium et le potassium, tandis que les anions incluent le phosphate, le chlorure et le citrate. Le tableau suivant présente les éléments minéraux essentiels avec leurs concentrations dans le lait de chèvre.

Tableau 2. Composition minérale du lait (Jeant *et al.*, 2007).

Éléments minéraux	Concentration (mg.kg ⁻¹)
Calcium	1043-1283

Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

2.2.5. Matière Grasse

La matière grasse du lait de chèvre est l'une des principales sources d'énergie, avec une quantité totale de lipides d'environ 4 % (Kongo *et al.*, 2016b). Les lipides incluent des acides gras, des triacylglycérols, et des phospholipides, tels que le cholestérol, la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, les glycolipides et les glycoprotéines membranaires. Les acides gras saturés et insaturés varient selon l'espèce (Jeantet *et al.*, 2018), et le lait de chèvre est notamment faible en acides gras polyinsaturés (Guétouache *et al.*, 2014). La matière grasse laitière est résistante à l'oxydation grâce à la présence naturelle d'antioxydants et d'acides gras saturés, bien que l'oxydation puisse être induite par la présence de métaux comme le cuivre ou l'exposition à la lumière (Renhe *et al.*, 2019).

2.2.6. Vitamines

Les vitamines sont essentielles pour la vie, jouant un rôle clé dans les réactions enzymatiques et les échanges au sein des membranes cellulaires (Vignola, 2002). Les vitamines hydrosolubles (groupe B et vitamine C) et liposolubles (A, D, E, K) sont présentes en quantités significatives dans le lait de chèvre (Freund, 1996; Jeantet *et al.*, 2008). Le tableau ci-dessous présente les concentrations moyennes des différentes vitamines présentes dans le lait de chèvre.

Tableau 3. Concentration en vitamines du lait de chèvre (FAO, 2002).

Vitamines	Concentration g/l
Vitamine A	0,24
B-Carotènes	<0,10

Vitamine E	2,3
Vitamine C	4,20
Vitamine B1	0,41
Vitamine B2	1,38
Vitamine B6	0,60
Vitamine B12	0,0008
Acidenicotinique	3,28
Acidefolique	0,006

2.2.7. Protéines

Les protéines du lait de chèvre, comme celles des autres mammifères, se divisent en deux fractions principales : les caséines et les protéines sériques. Les caséines représentent environ 80 % des protéines totales du lait de chèvre (Mahe et al., 1993). Le point de précipitation des caséines dans le lait de chèvre est de pH 4,2, tandis que celui du lait de vache est de pH 4,6 (Masle et Morgan, 2001). Les protéines sériques, qui constituent les 20 % restants, sont solubles dans les mêmes conditions de pH (Colline et al., 1991; Trujillo et al., 2000; Chanokphat, 2005).

Les enzymes, quant à elles, sont des composés organiques de type protidique produits par les cellules ou les organismes vivants et agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été identifiées dans le lait de chèvre (Pougheon, 2001).

2.3. Caractéristiques Physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques du lait de chèvre varient selon les études et les conditions locales (FAO, 1990). Le tableau suivant présente les principales constantes physico-chimiques du lait de chèvre.

Tableau 4. Les principales constantes physico-chimiques du lait de chèvre (FAO, 1990).

Énergie (Kcal/litre)	Densité du lait entier à 20°C	Point de congélation (°C)	pH à 20°C	Acidité titrable(D°)	Indice de réfraction
600- 750	1,027- 1,035	-0,550 - 0,583	6,45- 6,60	14-18	1,35- 1,46

2.4. Microbiologie du lait

En raison de ses propriétés physico-chimiques complexes, telles que sa richesse en nutriments, son pH neutre à légèrement acide et sa teneur élevée en eau, le lait constitue un environnement idéal pour la prolifération des microorganismes. Cette composition en fait un milieu de culture naturel qui favorise le développement d'une diversité de microbes, y compris les bactéries, les levures et les moisissures. En conséquence, le lait fraîchement prélevé peut contenir une grande variété de micro-organismes. Les scientifiques ont identifié que le lait contient deux types principaux de flore microbienne, chacun ayant des caractéristiques et des impacts différents sur la qualité du lait et la santé humaine (Guiraud, 2003).

2.4.1. Flore originelle

Guiraud (2003) explique que le lait, lorsqu'il est prélevé dans des conditions optimales et provenant d'un animal sain, contient peu de microorganismes, généralement moins de 10^3 germes par millilitre. Cette flore est principalement constituée de germes saprophytes issus du pis et des canaux galactophores. Toutefois, si le lait provient d'un animal malade, il peut contenir des germes pathogènes présentant des risques pour la santé, tels que les agents responsables des mammites, ainsi que des germes d'infections généralisées comme Salmonella, Brucella, Listeria monocytogenes, Mycobacterium, Bacillus anthracis, et certains virus. Le tableau ci-dessous présente une comparaison de la flore microbienne trouvée dans le lait provenant d'animaux sains et malades, illustrant les différences notables dans la composition microbienne.

Selon **Guiraud (2003)**, le lait présente peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des conditions optimales à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes / ml). Il est principalement composé de germes saprophytes de pis et de canaux galactophores. Cependant, lorsqu'il provient d'un animal malade, on peut trouver des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire, tels que les agents des mammites et des germes d'infection générale tels que la Salmonella, la Brucella, la Listeria monocytogenes, le Mycobacterium, le Bacillus anthracis et certains virus.

Tableau 5. La flore originale du lait (Guiraud, 2003).

Animal sain	Animal malade
Microcoques	Streptococcus pyogène
Streptocoques lactiques	Corynebacterium pyogènes,
Lactobacilles	Staphylococcus

1.1.1. Flore de Contamination

La contamination microbienne du lait peut survenir à partir de diverses sources externes. Selon Guiraud (2003), le lait est susceptible de se contaminer par des apports microbiens provenant des fèces de l'animal, du sol, de l'air et de l'eau. Ces sources de contamination peuvent introduire une large gamme de micro-organismes dans le lait, affectant sa qualité et sa sécurité sanitaire (Smith & Jones, 2020; Brown, 2018).

Les fèces de l'animal peuvent introduire des coliformes, des entérocoques, des Clostridium et des Salmonella dans le lait. Le sol est une autre source potentielle de contamination, apportant des Streptomyces, des Listeria, des bactéries sporulées et des spores fongiques. L'air et l'eau peuvent également contribuer à la contamination en introduisant une flore diverse et des bactéries sporulées (Guiraud, 2003).

Les effets de ces contaminations peuvent varier, allant de la simple détérioration de la qualité organoleptique du lait à des risques sérieux pour la santé humaine, comme les infections alimentaires. Une gestion adéquate de la production laitière, incluant des pratiques d'hygiène

strictes et des contrôles réguliers de la qualité du lait, est essentielle pour minimiser ces risques (Smith & Jones, 2020; Brown, 2018).

Le tableau ci-dessous présente une vue d'ensemble des principaux types de micro-organismes pouvant contaminer le lait à partir de ces différentes sources (Guiraud, 2003). Le tableau ci-dessous présente une vue d'ensemble des principaux types de micro-organismes pouvant contaminer le lait à partir de ces différentes sources.

Tableau 6. La flore de contamination du lait (Guiraud, 2003).

Fèces de l'animal	Sol	L'air et l'eau
Coliformes	Streptomyces	Flore diverses et Bactéries sporulés.
Entérocoques	Listeria	
Clostridium	Bactéries sporulés	
Salmonella	Spore fongique	

2. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB), également connues sous le nom de bactéries de l'acide lactique, sont un groupe diversifié de microorganismes capables de produire principalement de l'acide lactique par fermentation des sucres (Badis *et al.*, 2005 ; Labioui *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2014). Contrairement à de nombreux autres microorganismes, les LAB sont généralement considérés comme sûrs et ne provoquent pas de maladies, ce qui les classe comme "GRAS" (Generally Recognized As Safe) (Cintas *et al.*, 2001).

Les caractéristiques générales des LAB incluent l'absence de formation de spores, un caractère catalase négatif et une tolérance aux acides. Bien qu'elles préfèrent les conditions anaérobies, elles sont généralement capables de tolérer l'oxygène. Les LAB peuvent adopter différentes formes, telles que des coques (*Streptococcus*, *Lactococcus*), des bacilles (*Lactobacillus*) ou des coccobacilles (*Leuconostoc*) (Pringsulaka *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2014). De plus, les LAB ont une teneur en G+C relativement faible (moins de 55% molaire) (König et Fröhlich, 2017). Elles sont généralement des microorganismes mésophiles, mais peuvent se développer à des températures allant de 5°C à 45°C si nécessaire.

En ce qui concerne leur activité enzymatique, les LAB présentent une faible activité protéolytique et lipolytique, nécessitant ainsi un apport externe en acides aminés et en vitamine B (Caplice et Fitzgerald, 1999). Selon Georges et François-Marie (2008), le métabolisme des bactéries lactiques est essentiellement fermentaire. Elles se divisent en deux catégories : les bactéries homofermentaires qui produisent uniquement de l'acide lactique, et les bactéries hétérofermentaires qui produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et/ou de l'éthanol.

2.1. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquitaires et largement répandues dans l'écosystème, occupant diverses niches écologiques souvent associées à des matières premières telles que le lait et les produits laitiers, les légumes et les plantes, les céréales, la viande, les poissons et les produits carnés (Reis *et al.*, 2012; de Vries *et al.*, 2017). En outre, certaines espèces de bactéries lactiques se développent dans les voies respiratoires, intestinales et génitales des humains et des animaux (Wassie et Wassie, 2016; Rahman *et al.*, 2016).

2.2. Classification et typage

La classification des bactéries lactiques, établie initialement en 1919 par Orla-Jensen, repose sur des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques observables, et reste pertinente pour une identification préliminaire des microorganismes (Lahtinen *et al.*, 2012). Cette classification précoce se basait principalement sur la morphologie des bactéries, les divisant en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et en coques (Ho *et al.*, 2007).

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques, telles que la production de gaz à partir du glucose, la croissance à différentes températures, la tolérance aux concentrations élevées de sel et aux acides, ainsi que d'autres critères comme l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne, ont été utilisées pour différencier les espèces étroitement liées (Ho *et al.*, 2007). Par exemple, l'analyse du profil fermentaire des glucides par le système API50CH peut être utilisée pour identifier différentes espèces de bactéries lactiques (Curk *et al.*, 1993).

Cependant, certaines espèces sont difficiles à distinguer sur la base de caractéristiques phénotypiques seules (Gevers, 2002). Par conséquent, des techniques de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction en chaîne par polymérase (PCR) basée

sur des séquences répétées (rep-PCR) et la restriction fragment length polymorphism (RFLP) sont couramment utilisées pour caractériser et détecter les bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001) Figure 01.

Des indicateurs chimio-taxonomiques, comme la composition en acides gras et les composants de la paroi cellulaire, peuvent également être utiles pour la classification des bactéries lactiques (König et al., 2009).

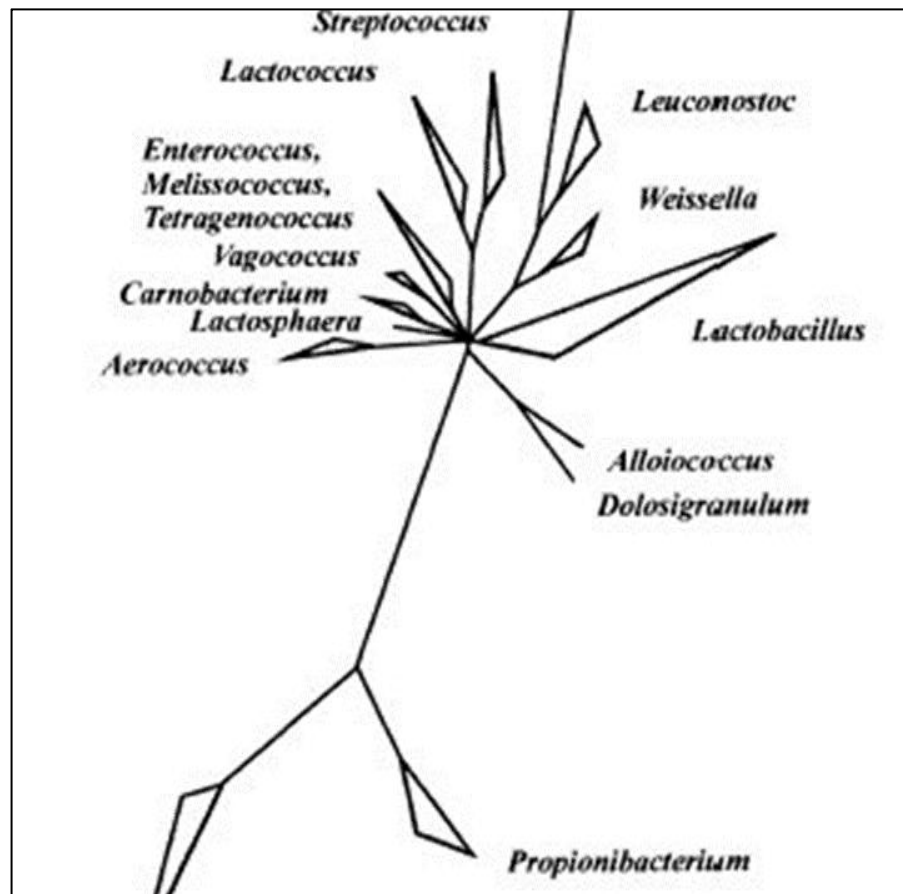


Figure 1. Arbre phylogénique basé sur la comparaison du gène de l'ARN 16S, montrant les relations entre les bactéries lactiques à faible pourcentage GC et les germes à Gram positif à haut pourcentage GC du genre *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

2.3. Principaux genres des bactéries lactiques

Le phylum XIII des Firmicutes, la classe I des Bacilli et l'ordre II des Lactobacillales regroupent les bactéries lactiques (BL). Plus de 500 espèces de BL sont répertoriées en genres groupés en six grandes familles (Fessard, 2017) :

- **Famille Lactobacillaceae** : Lactobacillus, Pediococcus.
- **Famille Aerococcaceae** : Abiotrophia, Aerococcus, Dolosicoccus.
- **Famille Carnobacteriaceae** : Alkalibacterium, Allofustis, Carnobacterium.
- **Famille Enterococcaceae** : Bavariicoccus, Catellicoccus, Enterococcus.
- **Famille Leuconostocaceae** : Leuconostoc, Fructobacillus, Oenococcus.
- **Famille Streptococcaceae** : Lactovum, Streptococcus.

Le genre Lactobacillus, regroupant plus de 145 espèces bactériennes, présente une grande diversité phylogénétique, phénotypique et écologique (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov et al., 2011). Les Lactobacillus sont des bactéries Gram positives se présentant sous forme de bacilles longs et fins, de coccobacilles à bâtonnets courts ou légèrement flexueux. Ils sont souvent regroupés en chaînes, sans spores et généralement immobiles (Siegumfeldt *et al.*, 2000 ; Singh et al., 2009). Ils présentent une catalase négative (Prescott et al., 2003) et se développent à une température optimale de 30 à 40 °C. Leurs besoins nutritionnels sont complexes, incluant des acides aminés, des vitamines, des acides gras, des nucléotides, des glucides et des minéraux (Khalid *et al.*, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994).

ORLA-JENSEN a divisé le genre Lactobacillus en trois catégories, une classification toujours utilisée dans le domaine industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud *et al.*, 2004 ; Bahiri, 2014) :

- Le groupe I, "Thermobacterium", comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus courantes dans l'alimentation sont Lb. helveticus, Lb. delbrueckii et Lb. acidophilus.
- Le groupe II, "Streptobacterium", utilise la voie homofermentaire mais peut également utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions, comme une concentration

limitée de glucose. Les espèces les plus courantes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. Plantarum*.

Le groupe III, "Betabacterium", englobe les espèces hétérofermentaires nécessaires qui génèrent des quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et/ou d'éthanol. Certaines espèces, telles que *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. Sanfransisco*, se trouvent dans les produits laitiers et carnés ainsi que dans le tube digestif humain, contribuant à l'équilibre de la flore intestinale.

II. La diversité génétique par les marqueurs moléculaires

Le développement et l'utilisation de marqueurs moléculaires pour explorer la diversité génétique des microorganismes sont des avancées majeures en génétique moléculaire. Diverses techniques sont employées pour estimer cette diversité. Les marqueurs dominants de l'ADN, tels que le RAPD (ADN polymorphe amplifié au hasard), le DAF (empreinte génétique de produits d'amplification), l'AP-PCR (amplification arbitraire de polymorphismes de l'ADN en chaîne), l'ISSR (répétitions de séquences inter-simples), l'AFLP (polymorphisme de longueur des fragments amplifiés), ainsi que les marqueurs codominants tels que le RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction), le SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide) et le STS (site marqué par une séquence), sont couramment utilisés (Garcia et Martinez, 2020).

Malgré l'évolution constante de nouvelles techniques, aucune n'est parfaite, mais elles répondent aux besoins de base des biologistes. Chaque technique présente des avantages et des limites. Cette revue propose une description des différentes techniques moléculaires pouvant être utilisées pour analyser la diversité génétique des bactéries lactiques et des empreintes génétiques, en mettant l'accent sur la technique RAPD utilisée dans notre étude (Brown & White, 2019; Patel & Singh, 2017; Smith & Jones, 2018; Garcia et Martinez, 2020). Ces différentes méthodes deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques, ils sont presque tous basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction = Réaction de Polymérisation en Chaîne).

1. Notion des marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont des outils essentiels pour caractériser les organismes étudiés, offrant une alternative précieuse aux marqueurs morphologiques traditionnels. Contrairement à ces derniers, les marqueurs moléculaires présentent un haut degré de polymorphisme et sont

moins influencés par les conditions environnementales, ce qui en fait des caractères mesurables avec une hérédité mendélienne (De Vienne, 1998).

Selon Kumar & Bennetzen (1999), un marqueur moléculaire est une séquence d'ADN située à une position connue sur un chromosome ou un gène, dont l'expression phénotypique est généralement reconnaissable et utilisée pour détecter un individu, ou comme sonde pour marquer un chromosome, un noyau ou un emplacement (Schulman, 2007).

Les marqueurs ADN sont parmi les types de marqueurs les plus couramment utilisés en raison de leur disponibilité et de leur neutralité sélective. Ils résultent de différents types de mutations de l'ADN, telles que des mutations de remplacement (mutations ponctuelles), des réarrangements (insertions ou délétions) ou des erreurs dans les répétitions d'ADN en tandem (Paterson, 1996). Contrairement aux marqueurs morphologiques et biochimiques, les marqueurs ADN sont en nombre pratiquement illimité et ne sont pas affectés par les facteurs environnementaux ou le stade de développement de la plante (P. Winter et Kahl, 1995).

2. Types des marqueurs moléculaires

2.1. Amplified Fragment Length Polymorphism (RFLP)

La méthode PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) s'est révélée efficace dans l'identification des bactéries lactiques, contribuant ainsi à accroître la fiabilité de l'identification des souches de bactéries lactiques présentes dans le kéfir (Mainville *et al.*, 2005; Rodas *et al.*, 2003; Claisse *et al.*, 2007). Cette technique implique l'amplification d'une région spécifique de l'ADN, suivie d'une digestion par une enzyme de restriction (Giraffa *et al.*, 2003). Lorsque cette méthode est utilisée pour l'amplification de l'ADN ribosomal 16S, suivie de la digestion du fragment PCR et de la séparation des produits de digestion sur gel, elle est appelée ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Vanechoutte, 1992). Bien que les profils ARDRA ne permettent généralement pas de distinguer les souches au sein d'une même espèce, ils permettent de classer grossièrement les bactéries.

2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

La technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), introduite par Vos *et al.* (1995) pour l'analyse des génomes végétaux, s'est avérée être l'un des outils les plus reproductibles pour discriminer les souches tant au niveau de l'espèce que de l'intraspécifique

(Janssen et al., 1996). Cette méthode repose sur la détection conjointe de polymorphismes de sites de restriction et de polymorphismes d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire.

Le principe fondamental de l'AFLP réside dans le fait que les variations dans les profils de bandes reflètent une relation génétique entre les souches bactériennes examinées. Ainsi, ces bandes peuvent être considérées comme des empreintes génétiques qui peuvent être analysées numériquement dans le but d'identification et de caractérisation (Janssen *et al.*, 1996).

Le concept de l'AFLP implique trois étapes principales : la digestion de l'ADN génomique à l'aide de deux enzymes de restriction et la ligation d'adaptateurs aux fragments générés, l'amplification sélective des fragments de restriction, et enfin la séparation électrophorétique sur gel polyacrylamide des fragments amplifiés. L'amplification des fragments de restriction est réalisée à l'aide d'amorces qui s'hybrident au niveau des adaptateurs du site de restriction (Aarts et *al.*, 1999).

La technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a été largement utilisée dans divers travaux pour étudier la diversité génétique des bactéries lactiques. Cette méthode offre une haute résolution et une grande reproductibilité, ce qui en fait un outil précieux pour différencier les souches bactériennes au sein d'une même espèce.

Une étude réalisée par Samelis *et al.* (2003) a utilisé l'AFLP pour évaluer la diversité génétique des souches de *Lactobacillus helveticus* isolées du fromage grec Graviera. Les résultats ont permis de mettre en évidence une variabilité génétique significative entre les souches, reflétant probablement les différentes origines géographiques des échantillons.

Gänzle *et al.* (2007) ont employé l'AFLP pour caractériser les souches de *Lactobacillus sanfranciscensis* isolées de levains biologiques français. Leur étude a révélé une grande diversité génétique au sein de cette espèce, suggérant une adaptation spécifique à l'environnement du levain.

Holzapfel *et al.* (2001) ont utilisé l'AFLP pour caractériser génétiquement les souches de *Lactobacillus casei* isolées de produits laitiers. Leur analyse a permis de distinguer différentes souches et de déterminer leur profil génétique unique.

Une étude de Torriani *et al.* (2001) a également utilisé l'AFLP pour différencier les souches de *Lactobacillus plantarum*. Leurs résultats ont montré une grande variabilité génétique entre les souches, reflétant probablement leur adaptation à des environnements alimentaires spécifiques.

Ben Slama *et al.* (2010) ont utilisé l'AFLP pour la détection et le typage épidémiologique des souches d'*Enterococcus faecium* isolées d'un hôpital tunisien. Bien que cette étude ne porte pas directement sur des bactéries lactiques, elle démontre l'applicabilité de l'AFLP pour la caractérisation des bactéries pathogènes présentes dans des environnements cliniques.

2.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Gevers *et al.* (2005) ont mis au point une méthode de typage des séquences multilocus (MLST) basée sur l'amplification par PCR. Cette approche standardisée implique l'analyse de séquences internes de sept gènes, généralement de 350 à 600 pb de longueur. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à une base de données de séquences précédemment caractérisées, permettant de classer les isolats en différents types de séquences (ST pour séquence types).

La méthode MLST (Multi Locus Sequence Typing) est une approche puissante pour étudier la diversité génétique des bactéries lactiques, offrant une résolution élevée et une grande reproductibilité (Maiden *et al.*, 1998). Cette méthode repose sur l'analyse de séquences de plusieurs gènes, appelés locus, présents dans le génome des bactéries. Chaque locus est amplifié par PCR, séquencé, puis les séquences obtenues sont analysées pour déterminer les variants alléliques (Maiden *et al.*, 1998).

Des études ont montré l'utilité de la MLST dans la caractérisation des populations de bactéries lactiques. Par exemple, l'application de la MLST a permis de révéler une grande diversité génétique au sein des souches de *Lactobacillus plantarum* isolées de différentes sources alimentaires (Torriani *et al.*, 2001). De même, des études ont utilisé la MLST pour différencier les souches de *Lactobacillus rhamnosus* et ont montré que cette méthode était capable de discriminer les souches provenant de différentes origines géographiques (Felis *et al.*, 2001).

En plus de sa capacité à caractériser les souches bactériennes, la MLST permet également de reconstruire des arbres phylogénétiques pour étudier les relations évolutives entre les souches. Par exemple, une étude sur *Lactobacillus sakei* a utilisé la MLST pour démontrer que les souches

isolées de différents environnements étaient regroupées en clusters distincts, suggérant une évolution adaptative à des conditions spécifiques (Chaillou *et al.*, 2005).

2.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Le RAPD (ADN polymorphe amplifié de manière aléatoire), ou, est une technique d'empreinte d'ADN basée sur la PCR, également connue sous le nom de réaction en chaîne par polymérase amorcée arbitrairement (AP-PCR). Cette méthode utilise une amorce avec une séquence arbitraire, généralement de 10 paires de bases générée aléatoirement, pour amplifier des fragments d'ADN de taille aléatoire. Il est également possible d'utiliser plusieurs amorces dans une seule PCR (RAPD multiplex) pour produire des profils RAPD plus fiables (Almagro *et al.*, 2004).

Après amplification, les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose pour obtenir un profil de bandes caractéristique de la souche étudiée. Ce profil est ensuite analysé à l'aide de logiciels spécialisés tels que GelCompar, qui permettent de déterminer la parenté ou la similitude des modèles de bandes avec les souches de référence d'une base de données. Un dendrogramme basé sur les coefficients de similarité est ensuite généré (Kauret *et al.*, 2017).

La méthode RAPD-PCR a été utilisée avec succès pour différencier les souches de bactéries lactiques, comme l'ont montré les travaux de Kaur et ses collègues. Par exemple, dans une étude menée par Almagro, Sanchez *et al.*, les auteurs ont utilisé la RAPD pour identifier les bactéries lactiques issues de la fermentation spontanée d'aubergines. Ils ont identifié 21 génotypes RAPD différents, regroupés en cinq clusters majeurs correspondant à différentes espèces de *Lactococcus* (Geverset *et al.*, 2005)

Les avantages de la technique RAPD incluent son applicabilité générale, son faible coût par réaction et le fait qu'aucune connaissance préalable de la séquence n'est requise. Cependant, la reproductibilité de la technique sur une période plus longue peut poser problème en raison de l'utilisation d'amorces non spécifiques (Kaur *et al.*, 2017).

La technique RAPD a été largement utilisée dans les études sur les bactéries lactiques en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de son faible coût. Cette méthode a été appliquée avec succès pour différencier et caractériser les souches de bactéries lactiques dans divers contextes.

Par exemple, une étude réalisée par Almagro, Sanchez *et al.* (2004) a utilisé la RAPD pour identifier les bactéries lactiques issues de la fermentation spontanée d'aubergines. Les auteurs ont identifié 21 génotypes RAPD différents, regroupés en cinq clusters majeurs correspondant à différentes espèces de *Lactococcus*.

De plus, Kaur et ses collègues (2017) ont utilisé avec succès la méthode RAPD-PCR pour différencier les souches de bactéries lactiques. Leur étude a montré que la RAPD-PCR était un outil efficace pour comparer les souches de bactéries lactiques à des souches de référence.

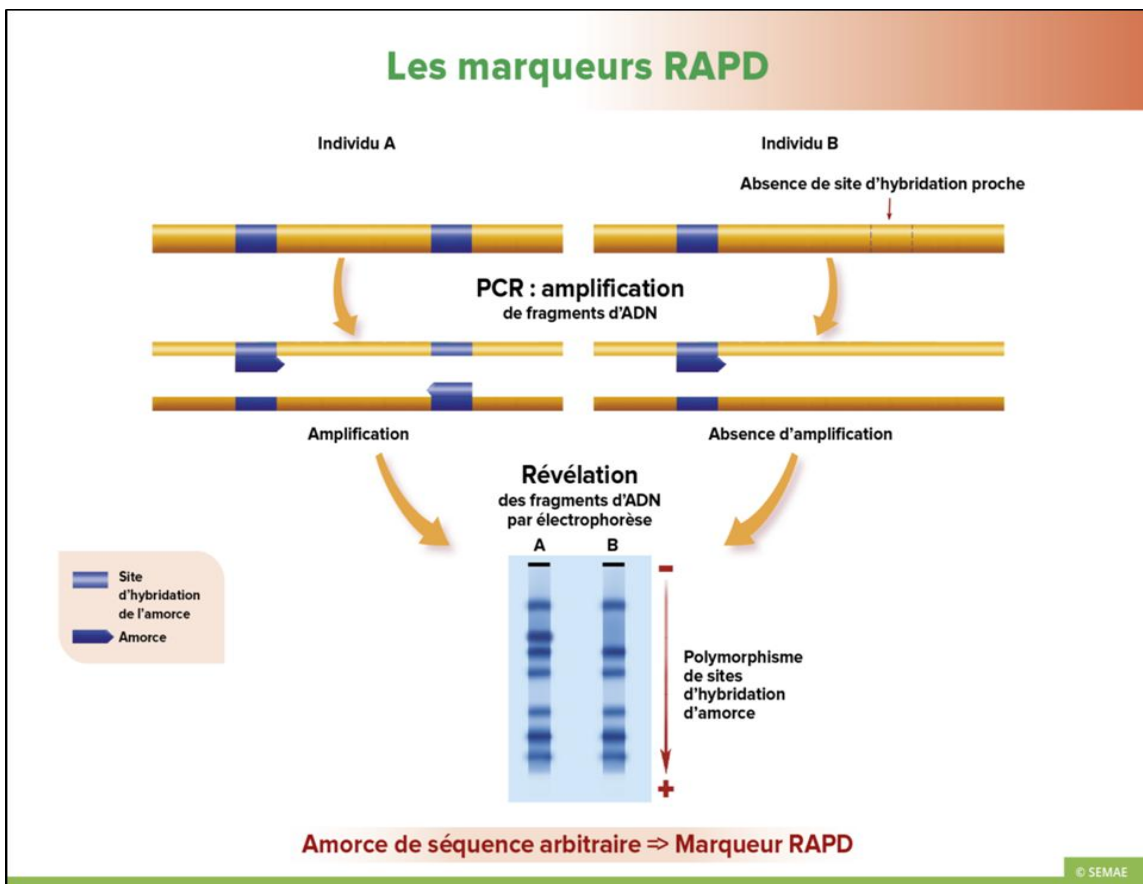


Figure 02 : Principe de la technique RAPD-PCR (<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS39GhCi4igEdFz3NQrfPQtf0eqcr1yTiHWag&s>)

Partie II. Expérimentale

Chapitre 2.

Matériels et méthodes

Chapitre 2. Matériels et méthodes

1. Échantillonnage et collecte du lait

Le processus de collecte et d'analyse du lait a été soigneusement planifié et exécuté pour garantir la précision et la fiabilité des résultats. Chaque étape, depuis la collecte des échantillons jusqu'à leur analyse en laboratoire, a été réalisée en suivant des protocoles stricts pour minimiser les risques de contamination et assurer la représentativité des échantillons.

Le lait utilisé dans cette étude provenait de différentes régions de la région de Biskra et de diverses races de chèvres seines, élevées dans des conditions appropriées. Après avoir nettoyé les mamelles des chèvres à l'eau et à l'alcool, le lait a été recueilli par traite manuelle. Les échantillons de lait ont été placés dans des flacons stériles d'une capacité de 180 ml, après que les mains aient été lavées et stérilisées. Ensuite, les échantillons ont été transférés au laboratoire à une température de 4 °C. Chaque échantillon a été soigneusement étiqueté avec le lieu et la date de prélèvement.

Tableau 7. Information sur les échantillons de lait collectés.

Echantillon	Race	Age	Site
Ch 1	kabyle	12	djamora
Ch2	Arabe	14	seryona
Ch3	Arabe	9	djamora
Ch4	Kabyle	10	seryana
Ch5	Mzab	6	branis
Ch6	Arab	9	ELhaouch

2. Methodologies

Les différentes étapes de la méthodologie suivie dans cette étude sont illustrées dans la figure ci-dessous. Cette figure présente un aperçu clair du processus, de la collecte des échantillons à l'analyse de la diversité génétique par RAPD-PCR, en passant par les différentes étapes.

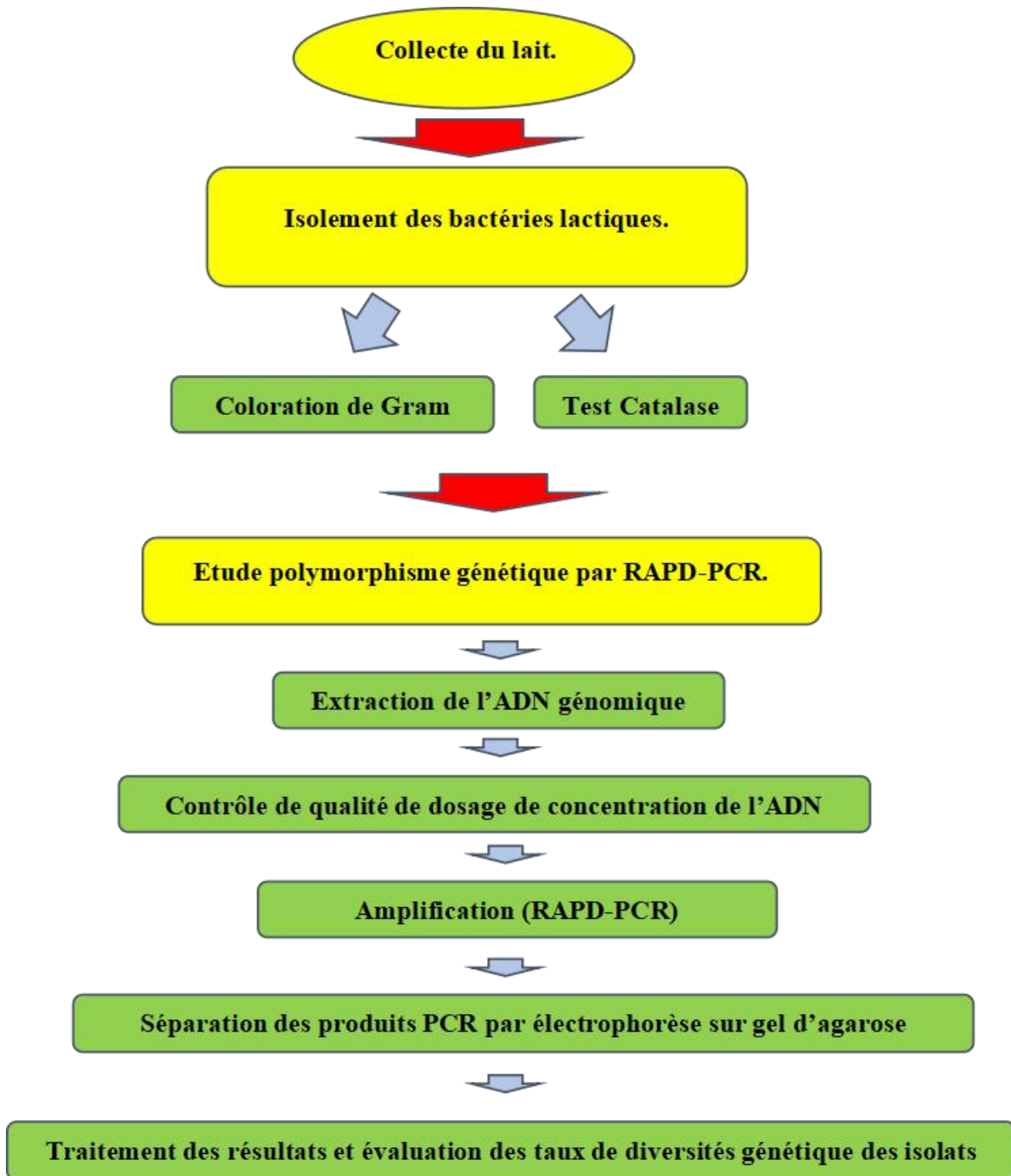


Figure 2. Méthodologie d'étude.

1.1. Isolement des Bactéries Lactiques

Une fois le lait arrivé au laboratoire, il est placé dans une incubatrice à 37°C pendant 48 heures. Cette étape d'incubation permet d'activer les bactéries lactiques présentes dans le lait. Après cette période, le lait de chèvre se sépare en deux phases principales : le caillé et le

lactosérum. Pour isoler les bactéries lactiques, le milieu de culture utilisé est la gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe), spécifiquement conçue pour favoriser la croissance des bactéries lactiques. Une petite quantité de lactosérum est prélevée après incubation et étalée à la surface de la gélose MRS à l'aide d'une pipette Pasteur, en utilisant la technique du râteau pour répartir uniformément l'échantillon sur la surface de la gélose. Après une nouvelle période d'incubation, des colonies blanches apparaissent, indiquant la présence de bactéries lactiques (Guiraud, 1998).

1.2. Purification des Isolats

La purification des isolats implique la réalisation de repiquages successifs sur gélose MRS. Cette méthode permet d'obtenir des cultures pures de chaque isolat bactérien. Les isolats sont repiqués à l'aide de la méthode des stries sur gélose MRS et incubées pendant 24 à 48 heures à 30°C. En parallèle, des bouillons MRS peuvent également être utilisés pour la culture des isolats. Ce processus de purification est essentiel pour obtenir des souches bactériennes stables et homogènes pour les analyses ultérieures (Guiraud, 1998).

Les étapes de l'isolement et de la purification des bactéries lactiques sont présentées en détail dans la figure 04. Cette figure illustre l'ensemble du processus, depuis l'arrivée des échantillons de lait au laboratoire jusqu'à l'obtention des souches bactériennes purifiées.

1.3. Identification des isolats

Les méthodes employées pour l'identification des souches incluent l'examen des caractères cultureux, qui concerne la manière dont les bactéries se développent et se comportent sur des milieux de culture spécifiques, tels que la gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe). L'examen morphologique est également essentiel, impliquant l'observation de la forme, de la taille et de la disposition des cellules bactériennes au microscope. Ces observations permettent de distinguer les différentes espèces de bactéries lactiques sur la base de leurs caractéristiques physiques distinctives (Guiraud, 1998).

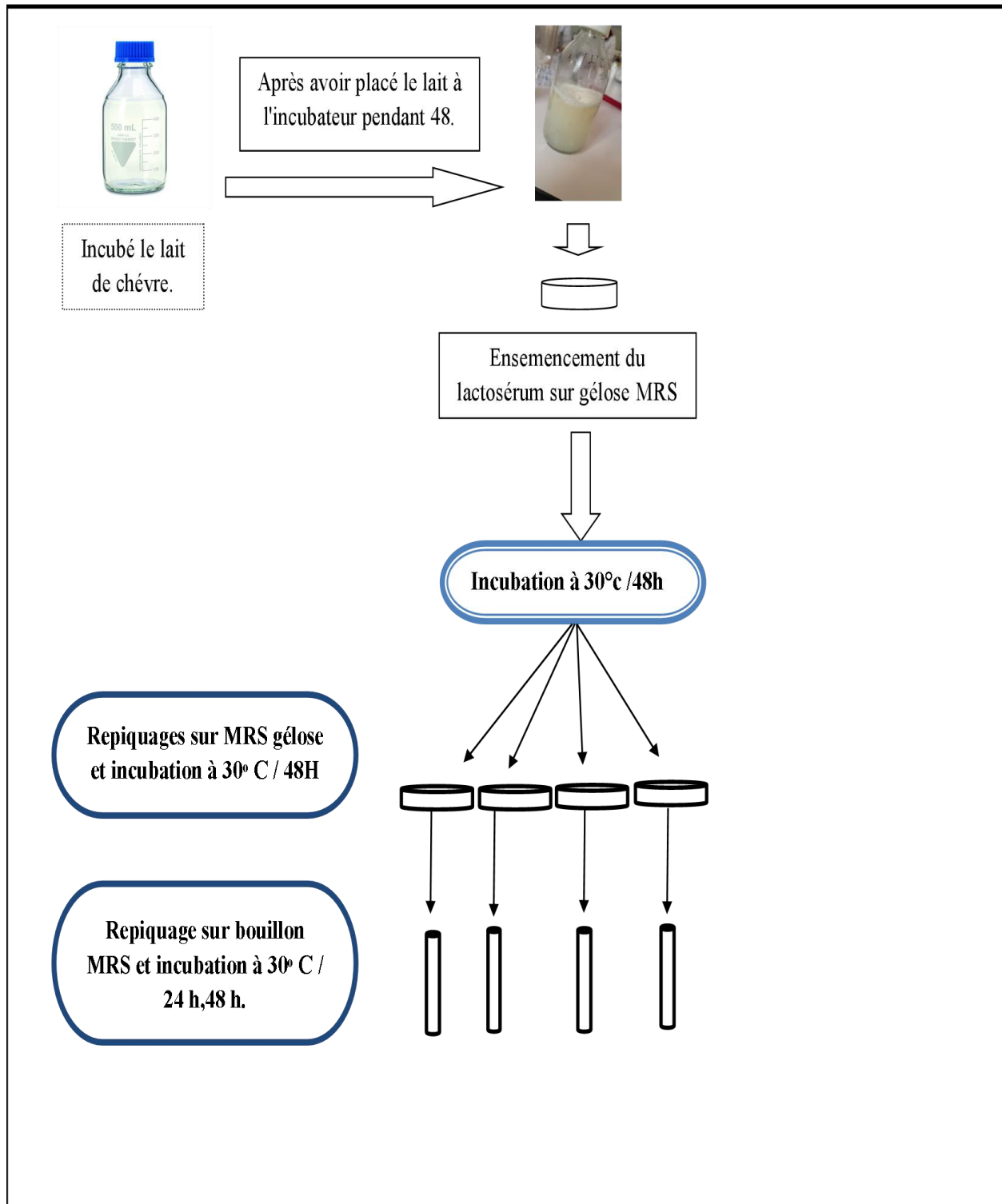


Figure 3. Isolement et purification des bactéries lactique.

L'identification comprend également la détermination du type de Gram, effectuée par la coloration de Gram, ce qui permet de classer les bactéries lactiques en Gram-positives (Paterson, 1996).

Le test de la catalase est un autre test clé pour l'identification des bactéries lactiques, qui sont généralement catalase-négatives (De Vienne, 1998).

1.3.1. Analyse Macroscopique

L'analyse macroscopique des colonies bactériennes vise à observer et décrire la taille, la couleur et la forme des colonies sur les milieux de culture. Ces caractéristiques sont essentielles pour une première identification des souches bactériennes.

1.3.2. Analyse Microscopique et Coloration de Gram

L'analyse microscopique permet de déterminer certains traits morphologiques et organisationnels des bactéries. Cette étape est cruciale pour identifier la forme (coques ou bacilles), l'organisation (en chaînettes ou isolées) et la classification des bactéries en Gram positif ou négatif (Saidi *et al.*, 2002). Ces caractères sont déterminés en utilisant la méthode de coloration de Gram selon le protocole suivant (Saidi *et al.*, 2002) :

Préparation de l'échantillon

- Prélevez une petite quantité de la colonie bactérienne à l'aide d'une boucle stérile.
- Étalez l'échantillon en une fine couche sur une lame de microscope propre.
- Laissez sécher à l'air libre.

Fixation

Fixez l'échantillon en passant rapidement la lame trois fois au-dessus d'une flamme.

Coloration primaire

Couvrez la lame avec du cristal violet pendant 1 minute.

- Rincez doucement la lame à l'eau distillée.

Mordantage

- Ajoutez du lugol (iode) sur la lame et laissez agir pendant 1 minute.
- Rincez à l'eau distillée.

Décoloration

- Appliquez de l'alcool ou de l'acétone pendant environ 10 à 20 secondes.
- Rincez immédiatement à l'eau distillée.

Coloration secondaire (contre-coloration)

- Couvrez la lame avec de la safranine ou de la fuchsine basique pendant 30 secondes.
- Rincez à l'eau distillée.

Séchage et observation

- Séchez délicatement la lame en la tapotant avec du papier absorbant.
- Observez la lame au microscope en utilisant l'objectif à immersion.

Les bactéries Gram positives apparaissent en violet, tandis que les bactéries Gram négatives apparaissent en rose ou rouge.

1.3.3. Test catalase

La catalase est une enzyme présente dans la plupart des bactéries aérobies strictes et des anaérobies facultatifs. Son rôle principal est de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène, entraînant la formation de bulles de gaz. Pour réaliser le test de la catalase, une colonie bactérienne est mélangée avec une goutte de peroxyde d'hydrogène. La présence de bulles de gaz indique un résultat positif pour la présence de catalase (Delarras, 2014).



Étude du polymorphisme génétique des isolats caséinolytiques par RAPD-PCR

2.4.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée en utilisant un kit de purification de l'ADN bactérien, le Innuprep Bacteria DNA Extraction Kit, selon le protocole recommandé par le fabricant.

a. Préparation du culot cellulaire

Après la culture des souches dans le bouillon MRS et leur incubation à 30°C pendant 48 heures, les cellules sont collectées par centrifugation à 12 000 rpm pendant 5 minutes.

b. Lyse cellulaire

Le culot cellulaire est suspendu dans 200 µl de tampon TE 1X (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH=8) en utilisant un vortex. La lyse cellulaire est réalisée en ajoutant 15 µl de lysozyme (10 mg/ml), suivi d'un vortex pendant 5 secondes et d'une incubation à 37°C pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules sont purifiées en ajoutant 200 µl de solution de TLS et 25 µl de protéine K (PK), puis en incubant à 50°C pendant 15 minutes avec un vortex toutes les 5 minutes pour assurer une suspension uniforme.

c. Fixation de l'ADN

Le surnageant est transféré dans un nouvel Eppendorf et 400 µl de TBS sont ajoutés. Le contenu est ensuite versé dans un filtre de centrifugation appliqué sur un tube récepteur pour fixer l'ADN, suivi d'une centrifugation à 10 000 g pendant 2 minutes jusqu'à ce que la solution passe complètement à travers le filtre.

d. Lavage de l'ADN

Le filtre de centrifugation est placé sur un nouveau tube récepteur pour purifier l'ADN en utilisant deux solutions de lavage : 500 µl de solution HS et centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute, puis 750 µl de solution MS et centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute.

e. Élimination de l'éthanol

L'éthanol est éliminé par centrifugation à vitesse maximale pendant 2 minutes

a. Éluition

Les spins filters sont transférés dans des tubes stériles de 1,5 ml, puis 75 μ l de tampon d'éluition sont ajoutés au centre de la membrane pour éliminer l'ADN. Après une incubation à température ambiante pendant une minute, l'ADN est précipité par centrifugation à 6000 g pendant 1 minute.

b. Stockage

L'ADN est conservé à 4°C pendant 24 heures avant l'analyse qualitative et quantitative, et à long terme à -20°C.

2.4.2. Dosage de la pureté et la concentration d'ADN

Le contrôle de qualité et la quantification de l'ADN ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre Nano Drop .Ce dispositif permet de mesurer la concentration et la qualité de l'ADN extrait en utilisant seulement 1 μ l de chaque échantillon. La densité optique (DO) à 260 nm est utilisée pour évaluer la concentration d'ADN, tandis que la mesure à 280 nm permet d'assurer la pureté de l'échantillon.

Le ratio D260/D280 est calculé pour évaluer la pureté de l'ADN extrait. Un ratio idéal se situe entre 1,8 et 2, indiquant une bonne pureté de l'ADN.

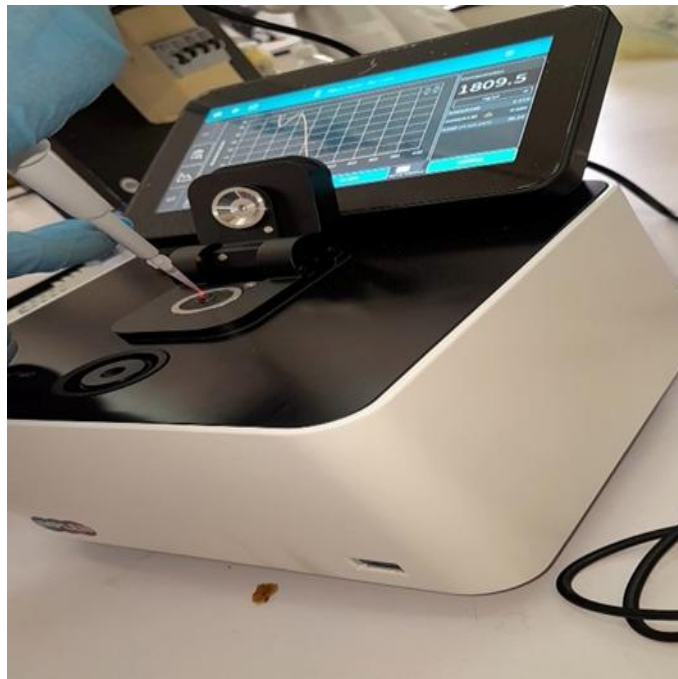
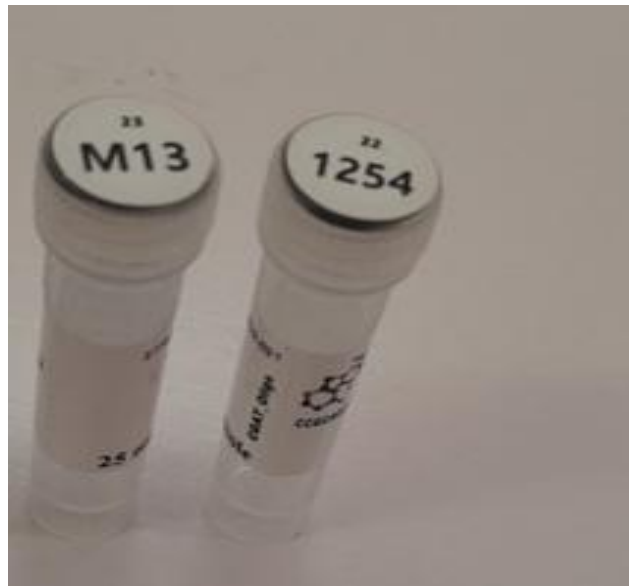


Figure 4. Dosage de l'ADN par Nanodrop.**2.4.3. Amplification (PCR)**

Pour l'amplification des échantillons, plusieurs amorces ont été utilisées selon la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Ces amorces sont conçues pour cibler des séquences d'ADN spécifiques par PCR (Polymerase Chain Reaction), permettant ainsi d'amplifier des régions d'intérêt génétique. Les amorces utilisées comprennent l'amorce 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3'), l'amorce M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), chacune sélectionnée pour ses caractéristiques uniques telles que la longueur, le pourcentage de GC, et la température d'hybridation (Th), comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8. Amorces RAPD Testées.

Amorce	Séquence (5' ___ 3')	Contenu GC%	Th(°C)
1254	5'-CCGCAGCCAA-3'	69	42
M13	5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'	66	36

**Figure 5.** Amorces utilisées pour RAPD-PCR.

La réaction d'amplification par RAPD-PCR a été réalisée avec un volume final de 25 μ l. L'ADN polymérase utilisé est Master mix double concentré HS Taq 2X. Le mélange réactionnel est détaillé dans le tableau suivant :

Tableau 9.

Réactif	Pour 1 échantillon(μ l)	Pour 1 échantillon (μ l)
HS Taq 2X	12.5	75
Eau ultra-pure stérile	10.5	63
Amorces (10 μ M)	1	6
ANDmatrice (50 ng/ μ l)	1	6

Le programme d'amplification est réalisé dans un thermocycleur de marque TECHNE (Prime) selon les paramètres suivants :

Tableau 10. Condition d'amplification de la RAPD-PCR avec l'amorce M13 selon (Giraffa *et al.*, 2000).

Etapas	Dénaturation primaire	45 cycles			Elongation finale
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	
T°C/Durée	94°C/2min	94°C/1min	42°C/20sec	72°C/2 min	72°C/10 min

Tableau 11. Les étapes d'amplification pour l'amorce 1254 selon (Akopyanz *et al.*, 1992).

Etapas	Dénaturation primaire	45 cycles			Elongation finale
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	

T°C/Durée	94°C/6min	94°C/1min	36°C/1min	72°C/2 min	72°C/10 min
-----------	-----------	-----------	-----------	------------	-------------



Figure 6. Programmation du Thermocycleur.

2.4.4. Séparation des produits RAPD-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose, selon Reece (2004), est une méthode permettant de séparer des fragments d'ADN de différentes tailles.

Les échantillons d'amplification ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5 % contenant un marqueur de taille 100 pb, sous une tension de 100V. Chaque produit PCR (8 μ l) a été mélangé avec 2 μ l de tampon de charge 6X avant d'être déposé dans les puits du gel.

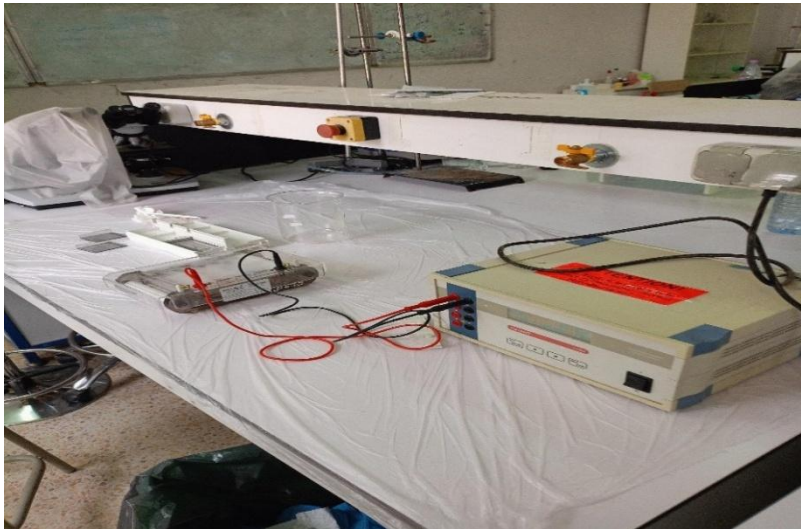


Figure 7. Séparation des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.

Après la migration, le gel est immergé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) pendant 20 minutes à température ambiante, protégé de la lumière. Le bromure d'éthidium interagit avec les paires de bases empilées de l'ADN et facilite, lors de l'exposition au rayonnement UV du gel d'agarose, la visualisation des bandes d'ADN sous forme de fluorescence.

Le gel est ensuite photographié à l'aide d'un système d'imagerie Doc-Print, VX2, générant des photos TIFF.



Figure 8. Révélation par le système Doc-Print, VX2.

2.4.5. Traitement des résultats

Le traitement des images des gels après électrophorèse et la détermination de la taille des bandes ont été effectués à l'aide du logiciel Capt. Les matrices de données ont été établies avec Excel 2016, tandis que les dendrogrammes ont été construits en utilisant le logiciel NTcys 2.01.

Chapitre 3.

Résultats et discussion

1. Résultats

1. Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques sur milieu solide MRS a donné naissance à des petites colonies rondes, lisses, opaques et de couleur allant du blanc au crème. Ces caractéristiques sont typiques des bactéries lactiques. La figure suivante illustre ces colonies.

2. Identification des bactéries lactiques.

2.1. Analyse macroscopique.

Six isolats ont été purifiés sur gélose MRS. Ils se présentent sous forme de colonies de petite taille, circulaires ou lenticulaires, à contour régulier et de couleur blanchâtre (figure 10). L'observation macroscopique des cultures en milieu liquide a révélé un trouble homogène pour tous les isolats, indiquant une bonne croissance après 24 heures d'incubation (figure 09).

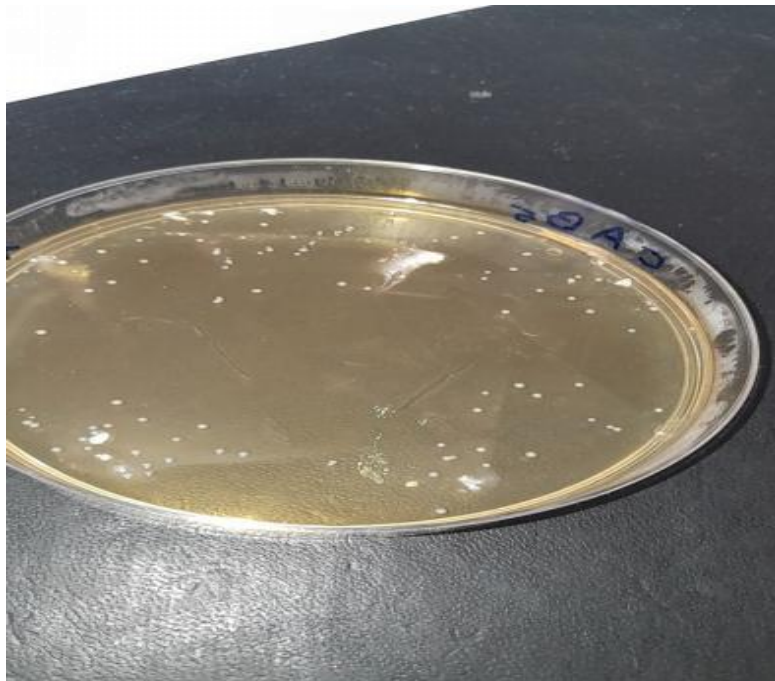


Figure 09 : Aspect de colonies purifiées sur gélose MRS.

2.2. Analyses microscopiques.

Après avoir effectué la coloration de Gram, nous avons observé les échantillons au microscope avec un grossissement de 100x en utilisant de l'huile à immersion. Toutes les bactéries examinées se sont révélées être Gram positives à 100 %. Elles se présentent visibles en paires, en amas ou occasionnellement en courtes chaînes. Deux morphologies principales ont été identifiées parmi les colonies (figure 10)

La majorité des isolats montrent une morphologie coccoïde, organisés en tétrades, en paires, en amas et parfois en courtes chaînes.

Certains isolats présentent une morphologie de coccobacilles, apparaissant isolés, en amas, en tétrades, ou en courtes chaînes.

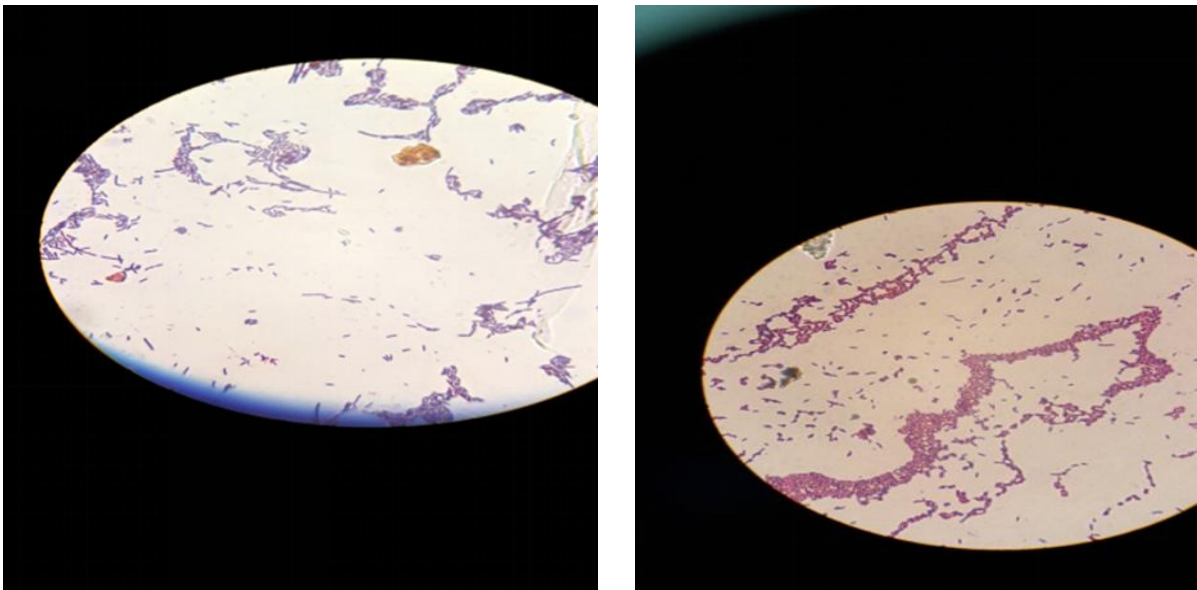


Figure 10 :Observation microscopique des isolats lactiques sur gélose MRS. X100

2.3. Test de catalase.

L'analyse de l'activité catalase a révélé que toutes les souches étudiées étaient catalase négatives. En effet, aucune effervescence n'a été observée après l'ajout d'une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à chaque souche (voir Figure 11)

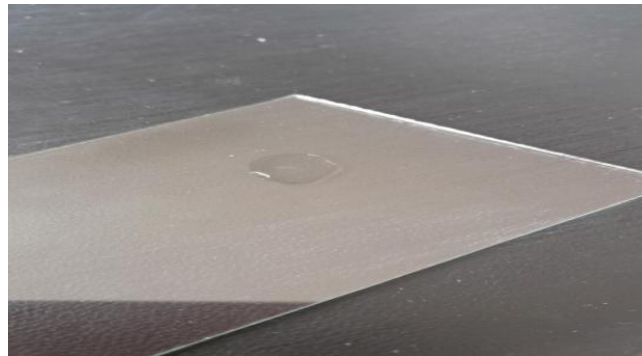


Figure 11: Résultat négatif du test catalase

Un récapitulatif détaillé a été élaboré. Le tableau suivant (Tableau 11) présente une synthèse des résultats obtenus concernant le type de Gram, l'activité catalase, ainsi que la forme et le mode de regroupement des différents isolats. Chaque échantillon de lait a été attribué un code spécifique, tout comme chaque isolat correspondant. Le tableau permet de visualiser clairement la morphologie des bactéries, leur classification en fonction de la coloration de Gram, et leur réaction au test de catalase.

Tableau 11: Récapitulatif de type de Gram, catalase, forme et mode de regroupement des isolats

Code de l'échantillon du lait	Code de l'isolat	Mode regroupement	Gram	Catalase
E1	S1	<i>cocci</i>	+	-
E2	S2	<i>cocci</i>	+	-
E3	S3	<i>cocci</i>	+	-
E4	S4	<i>Coccobacille</i>	+	-
E5	S5	<i>cocci</i>	+	-
E6	S6	<i>Coccobacille</i>	+	-

3. Etude du polymorphisme génétique des souches par RAPD-PCR

Six échantillons d'ADN génomique bactérien ont été extraits avec succès et conservés à une température de -20 °C pour garantir leur stabilité et intégrité. Ces échantillons d'ADN feront l'objet d'une étude moléculaire approfondie. L'objectif de cette étude est d'évaluer le taux de polymorphisme génétique entre les différents isolats bactériens. En analysant les variations génétiques présentes dans ces échantillons, nous pourrions obtenir des informations précieuses sur la diversité génétique et les relations phylogénétiques entre les souches étudiées.

3.1. Dosage de la pureté et la concentration d'ADN

L'utilisation du spectrophotomètre « NanoDrop » a permis de vérifier la pureté des échantillons d'ADN. Un rapport d'absorbance A260/A280 compris entre 1,8 et 2 est généralement considéré comme indicatif d'un ADN pur, exempt de protéines et autres contaminants. Les valeurs obtenues pour les différents échantillons sont présentées dans le tableau suivant

Tableau 12 : Concentration et pureté de l'ADN génomique.

Souche	[ADN] ng/μl	A260	A280	A260/A280
S1	1809.5	36.20	0.685	2.146
S2	683.55	13.69	0.186	2.081
S3	1219.9	24.40	2.245	2.146
S4	2895.9	58.01	1.894	2.278
S5	702,15	14.05	1.696	2.119
S6	1020	20.42	2.318	2.138

L'analyse des valeurs présentées dans le tableau 11, montre que tous les échantillons d'ADN ont des rapports A260/A280 supérieurs légèrement au-dessus de l'intervalle typique de 1,8 à 2,2, ce qui indique une bonne pureté.

La souche S1, avec une concentration de 1809.5 ng/μl et un rapport A260/A280 de 2.146, Cette dernière, suggère une légère contamination possible par des ARN ou d'autres acides nucléiques.

La souche S2 affiche une concentration plus faible de 683.55 ng/μl, mais avec un rapport A260/A280 de 2.081, elle demeure dans les limites excellentes de pureté.

La souche S3, avec une concentration de 1219.9 ng/μl et un rapport A260/A280 de 2.146, similaire à la souche S1, suggère encore une bonne pureté avec des valeurs légèrement au-dessus de 2. La souche S4 présente la plus haute concentration d'ADN à 2895.9 ng/μl avec un rapport A260/A280 de 2.278. Cette valeur, indique une légère surévaluation typique d'une faible contamination par des composés organiques.

La souche S5, avec une concentration de 702.15 ng/μl et un rapport A260/A280 de 2.119, montre une pureté satisfaisante légèrement supérieure à 2. Enfin, la souche S6 a une concentration de 1020.0 ng/μl avec un rapport A260/A280 de 2.138, indiquant une pureté acceptable

3.2. Analyse RAPD-PCR

Lors de la visualisation des gels, nous avons obtenu des photos et des profils de bandes à haute résolution, comme illustré dans les figures 12 et 13. Les résultats montrent des profils variés avec un nombre de bandes différent pour chaque isolat, ainsi que des tailles de bandes variées.

Les figures 12 et 13 démontrent clairement la diversité des profils obtenus. Chaque bande représente un fragment d'ADN distinct, et la variation dans le nombre et la taille de ces bandes indique des différences génétiques significatives entre les isolats.

3.2.1. Amorce M13

L'utilisation de cette amorce a permis de générer un nombre de bandes compris entre une et quatre, chacune ayant des poids moléculaires distincts. Parmi les bandes observées, neuf types de bandes polymorphes ont été identifiés, caractérisés par les poids moléculaires suivants : 1959,4 pb, 1655,7 pb, 1557,9 pb, 1452,4 pb, 1057,9 pb, 957 pb, 861,3 pb, 784,2 pb et 750 pb. Il est à noter que toutes les bandes obtenues sont polymorphes. La figure 12, présente les profils électrophorétiques enregistré par RAPD-PCR en utilisant l'amorce M13.

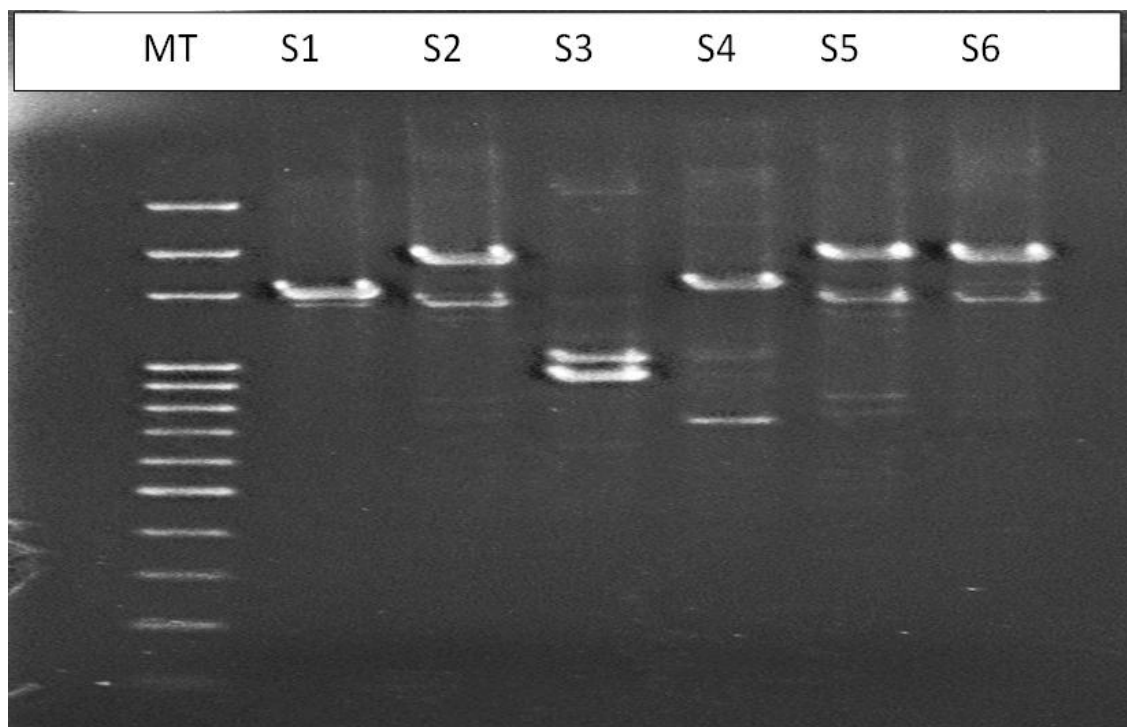


Figure 12: Profils électrophorétique RAPD-PCR avec l'amorce M13.

Le Tableau 13 présente le taux de polymorphisme observé dans l'échantillon étudié, exprimé en pourcentage de diversité génétique en fonction du nombre de bandes polymorphes et monomorphes détectées.

Tableau 13 : Taux de polymorphisme générer par M13

Nombre de bande polymorphe	Nombre de bande monomorphe	Taux de diversité
9	0	100 %

Ce tableau montre qu'il y a eu 9 bandes polymorphes détectées, aucune bande monomorphe, et donc un taux de diversité maximum de 100%.

Le Tableau 14 présente les résultats des diagrammes types des isolats S1 à S6 obtenus avec l'amorce M13. Chaque ligne représente une bande spécifique avec sa taille en base pairs et l'occurrence de cette bande dans chaque isolat, indiquée par un "1" pour présence et un "0" pour absence.

Tableau 14: Diagrammes types des souches avec l'amorce M13

Bandes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Polymorphisme
1959,4	0	1	0	0	1	1	Polymorphe
1655,7	0	0	0	1	0	0	Polymorphe
1557,9	1	0	0	0	0	0	Polymorphe
1452,4	0	1	0	0	1	1	Polymorphe
1057,9	0	0	1	0	0	0	Polymorphe
957	0	0	1	0	0	0	Polymorphe
861,3	0	1	0	0	1	0	Polymorphe
784,2	0	1	0	0	1	0	Polymorphe
750	0	0	0	1	0	0	Polymorphe

1: presence de la bande ; 0: absence de la bande

Le tableau révèle une variabilité dans la présence et l'absence de bandes spécifiques parmi les souches S1 à S6 étudiées. Par exemple, la bande de 1959,4 bp est présente dans S2, S5 et S6, mais absente dans S1, S3 et S4.

4.2.2. Amorce 1254

Cette amorce à générer un nombre de bande compris entre 3 et 11 bandes avec les poids moléculaires avec 19 types de bandes polymorphe identifiées par leurs poids moléculaires :

1970,2pb. 1324,2pb.1097,3pb. 773pb. 654,8pb .566,4pb .494,7pb .443,5pb. 369,9pb.

150,9pb .238,4pb. 305pb. 191,8pb. 563,7pb. 672,5pb. 817,5pb. 280,2pb. 296,7pb. 365,6pb.

Toutes les bandes polymorphes. La figure 13, illustre les profils électrophorétiques enregistré par RAPD-PCR en utilisant l'amorce 1254.

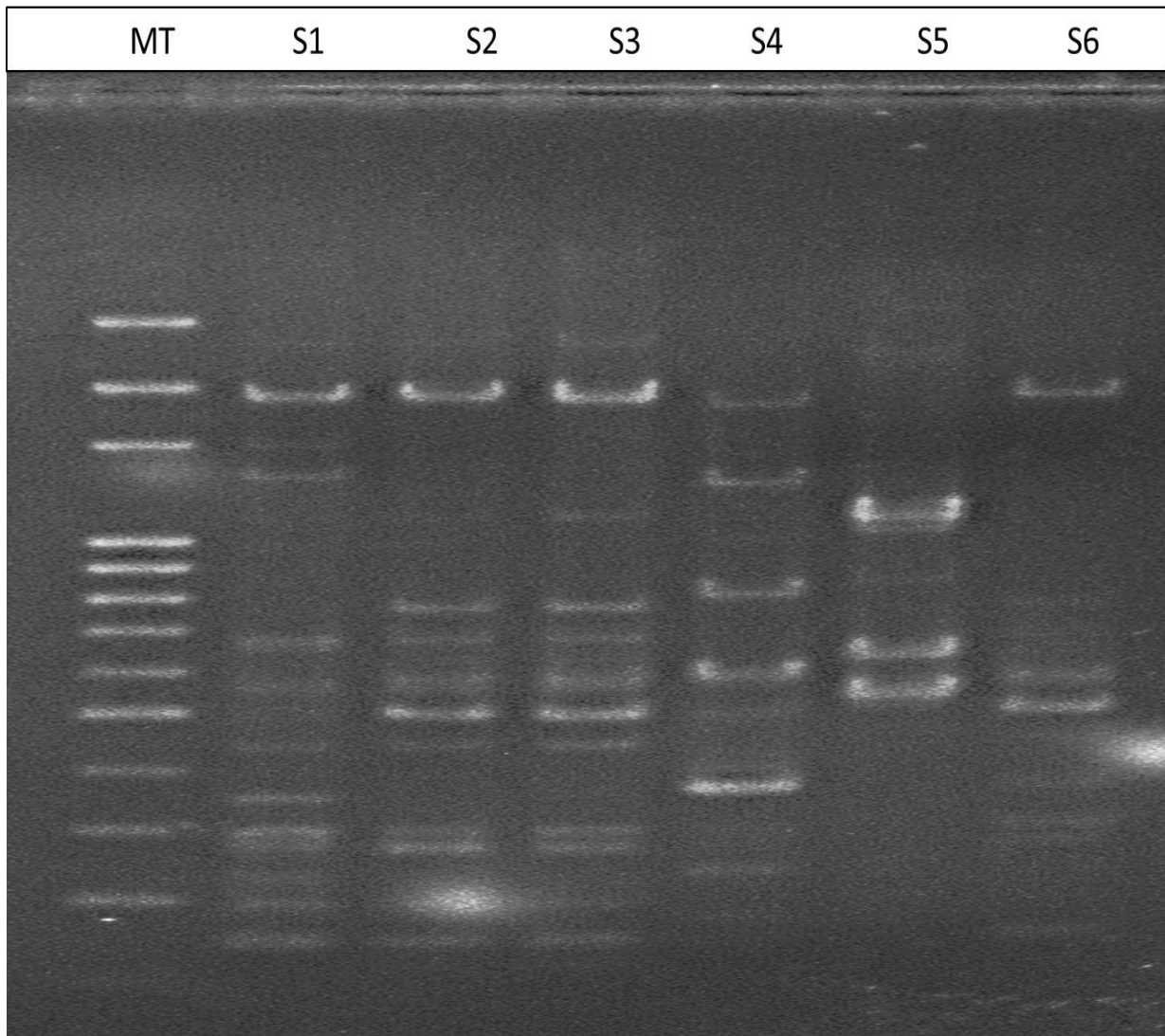


Figure 12: Profils électrophorétique RAPD-PCR avec l'amorce 1254.

Le Tableau 13 montre que le taux de polymorphisme observé dans isolats étudié, est en maximum ce qui indique une diversité génétique énorme des produits RAPD-PCR

Tableau 15 : Taux de polymorphisme généré par l'amorce 1254

Nombre de bande polymorphe	Nombre de bande monomorphe	Taux de diversité.
19	0	100%

Les diagrammes types de chaque souche sont enregistrés dans le tableau suivant.

Tableau 15: Diagrammes types des souches avec l'amorce 1254.

Bandes.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Polymorphisme
1970,2	1	1	1	1	0	1	Polymorphe
1324,2	1	0	0	1	0	0	Polymorphe
1097,3	0	0	0	0	1	0	Polymorphe
773	0	0	1	0	0	0	Polymorphe
654,8	0	0	0	0	1	0	Polymorphe
566,4	0	1	1	0	0	1	Polymorphe
494,7	0	1	1	0	0	1	Polymorphe
443,5	1	1	1	0	0	0	Polymorphe
369,9	0	0	0	1	0	1	Polymorphe
150,9	1	1	1	0	0	1	Polymorphe
238,4	1	1	1	0	0	0	Polymorphe
305	0	1	1	0	0	0	Polymorphe
191,8	1	0	0	0	0	0	Polymorphe
563,7	1	0	0	1	0	0	Polymorphe
672,5	1	0	0	0	1	0	Polymorphe
817,5	0	0	0	1	0	0	Polymorphe
280,2	1	0	0	1	0	0	Polymorphe
296,7	1	0	0	0	0	0	Polymorphe
356,6	1	0	0	0	0	0	Polymorphe

4.2.3. Matrice totale des diagramme-types

Le pourcentage de polymorphisme des 2 amorces M13 et 1254 est élevé égal à 100%.

Tableau 16: Matrice finale des 2 amorces.

Amorces	Bandes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	P /M
M13	1959,4	0	1	0	0	1	1	P
	1655,7	0	0	0	1	0	0	P u+
	1557,9	1	0	0	0	0	0	P u+
	1452,4	0	1	0	0	1	1	P
	1057,9	0	0	1	0	0	0	P u+
	957	0	0	1	0	0	0	P u+
	861,3	0	1	0	0	1	0	P
	784,2	0	1	0	0	1	0	P
	750	0	0	0	1	0	0	P u+
1254	1970,2	1	1	1	1	0	1	P
	1324,2	1	0	0	1	0	0	P
	1097,3	0	0	0	0	1	0	P u+
	773	0	0	1	0	0	0	P u+
	654,8	0	0	0	0	1	0	P u+
	566,4	0	1	1	0	0	1	P
	494,7	0	1	1	0	0	1	P
	443,5	1	1	1	0	0	0	P
	369,9	0	0	0	1	0	1	P
	150,9	1	1	1	0	0	1	P
	238,4	1	1	1	0	0	0	P
	305	0	1	1	0	0	0	P
	191,8	1	0	0	0	0	0	P u+
	563,7	1	0	0	1	0	0	P
	672,5	1	0	0	0	1	0	P
	817,5	0	0	0	1	0	0	P u+
	280,2	1	0	0	1	0	0	P
	296,7	1	0	0	0	0	0	P u+
356,6	1	0	0	0	0	0	P u+	

P : bande polymorphique, **M** : bande monomorphique, **Pu+** : bande polymorphique unique.

Tableau 17: Pourcentage du polymorphisme généré par les 2 amorces.

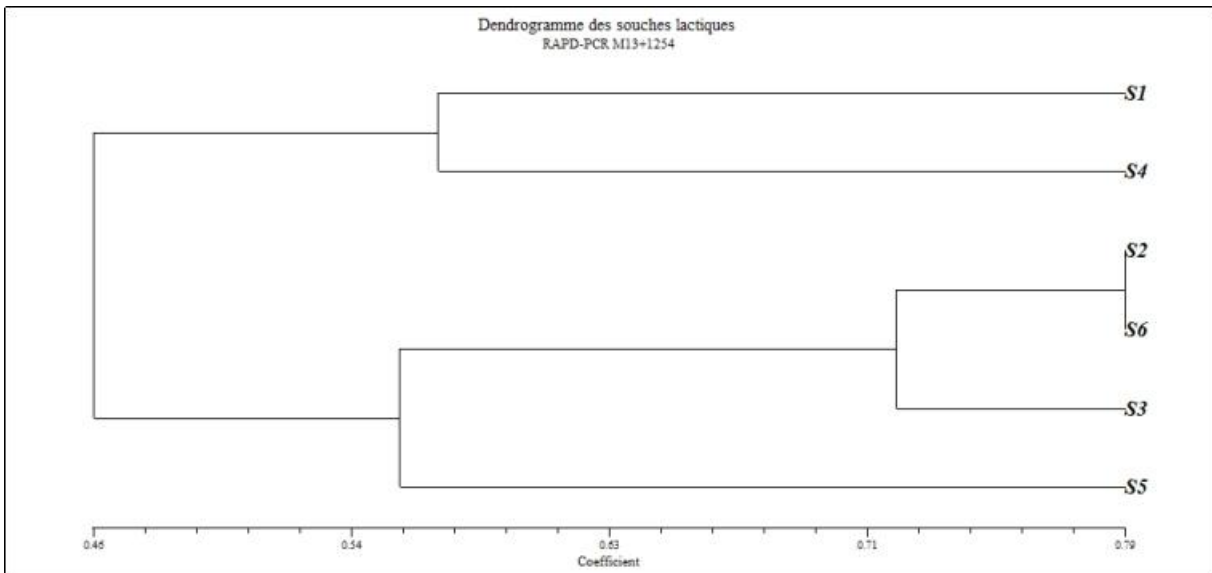
Amorces	Bandes totale	Bandes monomorphe	Bandes		% de polymorphisme
			Unique	Non	
M13	9	0	5	4	100
1254	19	0	7	12	100

Les résultats de notre étude ont été analysés à l'aide de deux amorces, M13 et 1254, pour évaluer le polymorphisme génétique par électrophorèse. La matrice des diagrammes-types montre que le pourcentage de polymorphisme pour les deux amorces est élevé, atteignant 100%.

Dendrogramme selon RAPD-PCR.

Le dendrogramme RAPD-PCR de six isolats est classé en deux groupes distincts à une distance de 0,46.

Le deuxième groupement étant le plus polymorphe que le premier.

**Figure 15:** Dendrogramme RAPD-PCR M13,1254

Le premier groupe est formé par 2 isolats, alors que le deuxième contient 4 autres divisés en deux sous-groupes :

Le premier groupe (S1, S4) : Les deux isolats présentent des similitudes génétiques très élevés, mais elles sont différentes des autres souches. Cela semble indiquer qu'elles pourraient avoir des caractéristiques génétiques particulières ou une origine commune.

Le deuxième groupe se structuré par quatre isolats (S2, S6, S3, S5), Le premier sous group (S2, S6, S3) contient un clade formé par les deux isolats S2 et S6 qui sont presque identiques ce qui suggère une grande similarité génétique entre eux.

Le deuxième sous group S5 :En générale, nous signalons que l'isolat S5 trouvée au niveau du deuxième groupe est génétiquement très éloignée de cinq restes souches.

Discussion :

L'étude des caractéristiques culturaux des isolats de lait de chèvre, a permet d'observé des colonies présentaient des caractéristiques typiques des bactéries lactiques : petite taille, bombées, et de couleur blanchâtre. Nos observations sont en accord avec plusieurs auteurs ayant étudié les bactéries lactiques. Gonzalez *et al.* (2008) ont également décrit des caractéristiques similaires chez les bactéries lactiques isolées du lait, telles que des colonies de petite taille, arrondies et bombées, avec une surface lisse et une couleur blanchâtre,

L'observation de l'absence de bulles dans cette étude indique que les souches de bactéries lactiques testées ne sont pas capables de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène, une réaction habituellement catalysée par l'enzyme catalase. Ce constat confirme que ces souches ne possèdent pas l'enzyme nécessaire pour métaboliser le peroxyde d'hydrogène (Todar, 2020).

Cette constatation est cohérente avec d'autres études qui ont également montré des résultats similaires chez certaines souches de bactéries lactiques. Par exemple, des recherches antérieures ont rapporté des analyses enzymatiques démontrant que diverses souches de bactéries lactiques peuvent présenter des profils enzymatiques différents, incluant parfois l'absence de certaines enzymes clés comme la catalase .

Dans le contexte de la biotechnologie alimentaire, la présence ou l'absence de l'enzyme catalase peut avoir des implications significatives. Par exemple, la capacité à dégrader le peroxyde d'hydrogène est cruciale pour la résistance au stress oxydatif et peut influencer la durée de vie des produits alimentaires fermentés .

En comparant ces résultats avec d'autres travaux, il est intéressant de noter que la pureté de notre ADN génomique extrais dans cette étude est conforme aux valeurs rapportées dans des recherches similaires. Par exemple, Giraffa et al. (2000) ont également observé des rapports A260/A280 proches de 2 pour des isolats de bactéries lactiques, ce qui confirme la pureté adéquate de l'ADN extrait. De même, Akopyanz et al. (1992) ont rapporté des valeurs similaires lors de l'extraction d'ADN de *Helicobacter pylori*, suggérant que les méthodes d'extraction et de purification utilisées sont efficaces et produisent des échantillons d'ADN de haute qualité.

En outre, Zhang et al. (2015) ont étudié l'extraction d'ADN génomique de diverses souches bactériennes et ont constaté que des rapports A260/A280 compris entre 1,8 et 2,2 sont indicatifs d'une bonne pureté de l'ADN, ce qui correspond aux résultats obtenus dans notre étude. De plus, les travaux de Sambrook et Russell (2001) sur les techniques moléculaires montrent que des rapports A260/A280 légèrement supérieurs à 2 peuvent indiquer une présence minimale de contaminants tels que des ARN ou des composés phénoliques, mais restent généralement acceptables pour la plupart des applications moléculaires.

En comparant ces données avec celles obtenues par Wilson (1997), qui a examiné l'extraction d'ADN à partir de bactéries gram-positives, il a été observé que des rapports A260/A280 légèrement supérieurs à 2 sont courants et peuvent être le résultat de légères variations dans les techniques d'extraction. Cependant, ces valeurs sont toujours considérées comme témoignant d'une bonne qualité de l'ADN extrait.

Ainsi, les résultats de cette étude sont en accord avec la littérature existante, soulignant la fiabilité des techniques d'extraction et de purification d'ADN utilisées. Les valeurs de pureté obtenues confirment que les échantillons d'ADN sont de haute qualité et adaptés à des analyses moléculaires ultérieures.

Les résultats de RAPD-PCR montrent une diversité génétique considérable parmi les isolats étudiés. La présence de bandes polymorphes indique des variations significatives dans les

séquences d'ADN entre les différentes souches. Par exemple, une bande de 1959,4 pb pourrait représenter un segment génétique spécifique présent dans certains isolats mais absent dans d'autres, soulignant ainsi la variabilité génétique.

En comparant ces résultats avec d'autres travaux, on constate une concordance avec les études précédentes. Giraffa *et al.* (2000) ont également observé une grande diversité de bandes polymorphes dans les isolats de bactéries lactiques, ce qui démontre un haut degré de polymorphisme génétique. De même, Akopyanz *et al.* (1992) ont rapporté des profils de bandes variables dans les isolats de *Helicobacter pylori*, indiquant une diversité génétique significative.

La variabilité des bandes, tant en nombre qu'en taille, est cruciale pour l'analyse des relations génétiques entre les isolats. Par exemple, des études de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ont souvent révélé des bandes polymorphes similaires, indiquant des variations génétiques au sein de populations bactériennes. Les bandes de 957 pb et 750 pb, par exemple, ont été fréquemment observées dans divers types de bactéries, suggérant des régions génomiques communes sujettes à des variations polymorphiques (Zhang *et al.*, 2015).

Ces observations sont essentielles pour comprendre les mécanismes évolutifs et la dynamique des populations bactériennes. Elles permettent aussi de développer des outils de typage plus précis pour l'identification et la classification des bactéries. En outre, la détection de ces bandes polymorphes pourrait avoir des implications pratiques pour le développement de nouvelles stratégies de traitement et de prévention des maladies bactériennes.

Les bandes générées et identifiées sont classées comme polymorphes, ce qui témoigne d'une diversité génétique significative parmi les souches étudiées. Le polymorphisme reflète la variation dans les séquences génomiques ou les profils génétiques des isolats, ce qui est essentiel pour identifier des différences potentiellement significatives entre les souches. Cette diversité peut jouer un rôle crucial dans l'adaptation des micro-organismes à leur environnement et dans leur capacité à répondre aux changements environnementaux (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994).

Les bandes spécifiques détectées à l'aide de l'amorce M13 et 1254 permettent de caractériser les profils génétiques des isolats. La présence ou l'absence de bandes particulières peut indiquer des variations dans des régions spécifiques du génome, ce qui pourrait influencer des caractéristiques

phénotypiques telles que la virulence, la capacité métabolique ou la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes étudiés (Akopyants et al., 1992).

Un taux élevé de diversité génétique a été observé chez les six isolats de bactéries lactiques, basé sur les deux diagrammes-types générés par les amorces RAPD testées. Les amorces M13 et 1254 ont montré un taux de polymorphisme élevé de 100% (Aysun Cebeci & Candan Gu˘rakan, 2011). Ce résultat est similaire à celui trouvé par ces auteurs, qui ont caractérisé cinq isolats avec un polymorphisme moyen de 89,5% pour l'amorce M13. De plus, l'amorce 1254 a également montré un taux élevé de polymorphisme de 100%, comparable au taux de 87,5% rapporté par Aysun Cebeci et Candan Gu˘rakan (2011).

Conclusion

Conclusion

Au cours de cette étude, 6 isolats de bactéries lactiques ont été isolés à partir de 6 échantillons de lait provenant de différents races de chèvres de la région de Biskra

Notre étude a été menée pour évaluer les polymorphismes génétiques des isolats lactiques à l'aide d'un marqueurs moléculaires RAPD-PCR. Les marqueurs moléculaires RAPD-PCR testés ont révélé un taux de polymorphisme significativement élevé. Ces résultats reflètent que les différences de région et de type de chèvre affectent la diversité génétique des chèvres.

La diversité génétique examinée par les marqueurs moléculaires RAPD-PCR réalisée à l'aide des amorces M13 et 1254 a montré une énorme variation génétique malgré le nombre limité d'isolats testés.

En outre, d'autres techniques comme l'AFLP et les SSR (microsatellites) pourraient également être explorées dans le cadre de futures recherches pour une caractérisation encore plus détaillée et exhaustive des souches de bactéries lactiques, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour l'amélioration continue des produits laitiers fermentés et leur impact sur la santé humaine.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Rementeria A., Gallego L., Quindos G., Garaizar J. 2001. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(6):331-336.
 2. Cebeci A., Gürakan G. C. 2011. Comparative typing of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains using multilocus sequence typing and RAPD-PCR. *European Food Research and Technology*, 233:p377-385.
 3. Bey D., Laloui B. 2005. Les teneurs en cuivre dans les piols et l'alimentation des chèvres dans la région d'El-Kantra (Biskra). Thèse. Doc. Vêt. (Batna).60- 270p.
 4. Casaburi A., Aristoy M. C., Cavella S., Monaco R., Ercolini D., Toldrà F., Villani F. 2007. 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).295-307p.
 5. Phadungath C. 2005. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1).201-212p.
 6. Cintas L. M., Casaus M. P., Herranz C., Nes I. F., Hernández P. E. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4) .281-305p.
 7. Collin J. C., Kokelaar A., Rollet-Repecaud O., Delacroix-Buchet A. 1991. Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®): comparaison des résultats. *Le Lait*, 71(3).339-350p.
 8. Mohania, D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., Jain S. ,Marotta F., Singh V., Parkash O., Yadav H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*, 9(4). 190-198p.
 9. Daddaoua A., Puerta V., Requena P., Martínez-Férez A., Guadix E., Medina, F. S., Zarzuelo A., Suarez M .D., Boza J. J., Martínez-Augustin O. 2006. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of nutrition*, 136(3):672-676p.
 10. Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire .Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, pp: 65-66-67- 111-113-114.
 11. Zakhia, F., Lajudie P. 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques— application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*, 52(3): 169-181p.
 12. Favier J. C. 1985. Composition du lait de vache. II. Lait de consommation. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 20(5) :355-363p
 13. Freund. 1996. Guide pratique de l'élevage, Royal Canin, édition 3
 14. Guiraud J. P. 2003. Microbiologie alimentaire, édition: Dunod.Paris :615p.
 15. Zmr H., Bam E., Magdoub M., Nf T., Zim S.,Amm M . 2016. Molecular identification of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy product. *Food Science* .5(12): 3221-3230p.
-

16. Hellal F. 1986. Contribution à la connaissance des races caprines algériennes : Etude de l'élevage caprin en système d'élevage extensif dans les différentes zones de l'Algérie du nord. Thèse. Ing. Agro.INA. El Harrach. Alger.
17. 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):365-373p.
18. Kaur J., Lee S., Park Y. S., Sharma A. 2017. RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT*, 77:p383-388.
19. Gremaud J., L., Gehrig, C., Sabatasso, S., Castella, V. 2008. Identification génétique de personnes défuntes. *Revue Médicale Suisse*. 4(164): p 1615-1618.
20. Jeantet R., Corguennec T., Machtra M., Schuk P., Brule G .2008. Les productions laitiers. Ed Tech et Doc, Lavoisier. Paris. p2-9.
21. Van Hoorde K., Vandamme P., Huys G. 2008. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5): p 445-455.
22. Anggraini L., Marlida Y., Wizna W., Jamsari, J., Mirzah M., Adzitey F., Huda N. 2018. Molecular identification and phylogenetic analysis of GABA-producing lactic acid bacteria isolated from indigenous dadih of West Sumatera, Indonesia. 7:p1 -15p.
23. Martinez-Ferez A., Rudloff S., Guadix A., Henkel C. A., Pohlentz G., Boza, J. , Guadix A., Henkel G. A., Pohlentz G, Boza, J .J, Guadix E. M, Kunz C. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal*, 16(2) :p173-181.
24. Mathieu J. 1998. Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, Lavoisier, Paris. milk proteins. *Critical reviews in food science and nutrition*, 28 ;p 115-136
25. . Huybens N., Mainil J., Marlier D. 2009. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. In *Annales de médecine vétérinaire* Vol. 153, No. 2. ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.112-128p.
26. Ward P., Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*, 85(1-2). 23-32p.
27. Moraes P. M., Perin L. M., Silva Júnior A., Nero L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:p109-112.
28. Pensuet, P., Toussaint G. 1984. La chèvre. In : L'élevage des chèvres et des moutons. Paris.
29. Roberfroid M. B. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2):p406-409
30. - Saiki, R. K., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):p487-491.
31. St-Gelais D., Baba Ali O., Turcot S. 2000. Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. Site du ministère de l'agriculture et agroalimentaire du Canada. Disponible sur: http://res2.agr.gc.ca/crda/pubs/chevre200-goat2000_f.htm.

32. Sun Z., Yu J., Dan T., Zhang W., Zhang, H. 2014. Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: fundamentals and Practice: p1-101*.
33. . Ahbrizal T., Radu S., Latif A. R. A. ., Mutalib A. R., Rusul G., Elhadi N. 2000. Random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles and shrimps. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 7(1): p 41-46.
34. Tedjani K. 2010. Les races caprines en Algérie. www.nouara-algerie.com.
35. Trujillo A. J., Casals I., Guamis B. 2000. Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of dairy science*, 83(1): p 11-19.
36. Wassie M., Wassie T. 2016. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(8): p44-49
37. Abdelguerfi A. 2003 .Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Rapport de synthèse, Plan d'action et stratégie nationale sur la biodiversité. Projet ALG/97/G31 FEM/PNUD., Tome. IX, 78p.
38. -Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., Kresovich S .,Berg D. E. 1992 . *Nucleic Acids Res.* 20, 5137-5142. Ris. 615p.
39. Amiot J, Fournier S, Lebeuf Y, Paquin Simpson R. 2002. In Vignola C.L, coord, AmiotJ, AngersP, collab, sciences et technologie du lait technologique et techniques d'analyse du lait. Canada, Presses Internationales Polytechniques. 1-73p.
40. Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot--Maréchal R. et Yvon M., (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec Doc, Lavoisier. Paris. p271-447.
41. Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyles". *Sciences Technologie. C, Biotechnologies*, (23).p30-37.
42. Belarbi F. 2011. Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes .88p.
43. BelmihouB b: eddine D. 1997 .Caractéristiques des quelques population caprines Algériennes, salon caprine Laghouat (du 27 au 29 avril 1997). 5p.
44. Bey D., Laloui S. 2005. Les teneurs en cuivre dans les piols et l'alimentation des chèvres dans la région d'El-Kantra Biskra. Thèse. Doc. Vêt. (Batna) .60-270p.

45. Bidot Fernandez A. 2017. Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Revista de Producción Animal* 29 .p 32-41.
46. Caplice E., Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50 .p 131–149.
47. Curk, M.C., Peladan F., Hubert J.C. 1993. Caractérisation biochimique des lactobacilles
48. DaHmani M et CHEBABHA S .2015 . Caractérisation de l'élevage caprin dans la région de M'sila. Mém de Master., Univ., M'Sila. 63p.
49. DOYON A.2005.Influence de l'alimentation sur la composition du lait de chèvre revue des travaux récents. Colloque sur la chèvre. CRAAQ :p1-23.
50. FAO.2002. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Chapitre laits fermentés. Collection FAO/Alimentation et Nutrition ,28.p7.
51. FAO. 1990. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et nutrition .23p.
52. Feliachi K. 2003.Rapport national sur les ressources génétiques animales; Algérie. Commission nationale, point focal Algérien pour les ressources génétiques. p1-4.
53. French M.H. 1971. Observation Sur La Chèvre. Etudes Agricoles. Ed: F.A.O, Roman. 80. p 19-21.
54. Georges C., François-Marie L. 2008. Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier (pp. 1-787).
55. -Gevers D.2002.Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dryGhozlane D. 2012. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arôme (diacétyle). Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-Harrach, Science Alimentaire. 111p.
56. Giraffa, G., Neviani E. 2000. Molecular identification and characterisation of food associated lactobacilli. *Ital. J. Food Sci.* 12:p 403 – 423.
57. Guiraud J.P.1998. Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris
58. Habuit P.1974. Eléments de zootechnie générale, Ed J-B Baillièrè, Paris, p61.
59. Haenlein, G. 2004. Caprine milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 51.p 155-163.
60. Ho T.N.T., Taun N., Deschamps A., Cauber T. 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam: Workshop on Food Safety and Processing Technology: p134-142.
61. Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. ET Schillinger U.2001. Taxonomy.
62. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G.2007. Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits. Paris, Lavoisier : 456-457p.
63. Jeantet R., et Croguennec T, (2018). Eléments de biochimie laitière. In: Le fromage. 77-96.
64. Schleifer K.H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W. Amann R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 5(8): p1081-1094.

65. Kongo J.M., et Malcata F.X. 2016. Cheese: Chemistry and Microbiology. In Encyclopedia of Food and Health. Elsevier :p 735-740.
66. König H., et Fröhlich J. 2009. Lactic Acid Bacteria, Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
67. König, H., et Fröhlich J. 2017. Lactic acid bacteria. In Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Springer, Cham:p 3-41.
68. Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., Wright A.V. 2012. Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor Francis Group. Boca Raton London New York.
69. Mahe M. F., Manfredi E., Ricordeau G., Piacere A., Grosclaude F. 1993. Effets du polymorphisme de la caséine α S1 caprine sur les performances laitières : Analyse.
70. Masle I., et Morgan F. 2001. Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques - Facteurs de variation liés à la composition du lait. Lait, 81:p561-569.
71. Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G. M. 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore. Nutritional value of raw milk. Issues Biol. Sci. Pharm. Res. 2(10) :p 115-122
72. Ouadghiri M. 2009. Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine.
73. -Pellegri P. 1999. De l'idée de race animale et de son évolution dans le milieu de l'élevage. Association des ruralistes français. 5. Ruralia n° 1999-05, Varia. proceeding of the Sixth » International conference on goats, Beijing China: pp7857-93.
74. Physicochemical Characteristics of Raw Milk, Raw Milk, Elsevier Inc..p29-43. Pougheon S. 2001. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse. France :p 34 -102.
75. Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., & Rangsiruji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food Control, 23(2), 547-551.
76. Rahman M.M., Hossain K.M., Rahman S.M. 2016. Isolation, characterization, and properties study of probiotic lactic acid bacteria of selected yoghurt from Bangladesh. African Journal of Microbiology Research, 10(1):p 23-31.
77. Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. Small Ruminant Research 79.p 57-72.
78. Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A.C. 2004. Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Third edition Taylor Francis Group. Boca Raton London New York.
79. Sperber. H., Swan J. 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. Environ Microbiol, vol.31 :p 990-991.
80. Stanfield D.P. 1975. Génétique, Cours et problèmes, 1ère Ed. Série Schaum Mc Graw Hill, Paris: pp 193-201.

81. Gelais D., Baba Ali O., Turcot S. 2000. Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. In "Site du ministère de l'agriculture et agroalimentaire du Canada. "
82. Stiles, M. E., Holzapfel W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36.p 1-29.
83. Sun, Z., Yu J., Dan T., Zhang, W., Zhang H. 2014. Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria* (pp. 1-101).
84. Tazi M. 2001. Etude de quelques aspects de l'élevage caprin en Algérie. Ed. Alpha agri-plus, journée d'étude sur l'élevage caprin
85. Thompson J., Gentry-Weeks C.R. 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1: p239-290.
86. Turton J. D. 1974. The collection, storage and dissemination of information on breeds of livestock, *Proceeding of the 1rst World Congress on Genetic Applied to Livestock Production*, II: p 61-74.
87. Vignola C.L., Michel J.C., Paquin P., Moineau M., Pouliot M. et Simpson R. 2002. Science et technologie du lait : Transformation du lait. *Techniques et documentation La voisier*. 600p.
88. Vinge J. P. 1988. Les Grandes Etapes De La Domestication De La Chèvre : Une Proposition d'explication De Son Statut En Europe Occidentale. *Ethnozootechnie*. Ed N° 41.
89. Wehrmueller K., Jakob E., Ryffel S. 2008. Orotic acid content in cow's, ewe's and goat's milk. *Agrarforschung* (Switzerland).
90. Wilson A. R., Sigee, D., Epton H.A. 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SKI against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of applied microbiology* 99. 1516-1522.
91. Zeller B. 2005. Le fromage du chèvre : Spécificités technologiques et économique. Thèse de Doctorat., Univ. Paul-Sabatier. Toulouse. France. 112p.

Annexe

Annexe 1

❖ Coloration de gram:

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 1 minute
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de Lugol pendant 1 minute
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuchsine pendant 1 minute
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

- ✓ Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

❖ Les tampons et solutions nécessaires à l'électrophorèse sur gel d'agarose et l'extraction d'ADN

○ Préparation de gel d'agarose

TBE100 ml

Agarose1.5 g

○ Solution de Tris borate EDTA 1 X (TBE)

Tris.....10.8 g

Acide borique5.5 g

EDTA0.75 g

Eau.....100 ml QSP 900 ml

Annexe 2

1. La composition des milieux de culture

- La composition gélose MRS :

Peptone	10 g
Extrait de viande.....	8 g
Extrait de levure.....	4g
Glucose	20 g
Citrate d'ammonium.....	2g
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium.....	2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2 g
Agar	10 g
PH.....	6.2
Eau distillée	100ml
- La composition de boillon MRS : tous les composants de gélose MRS sauf l'agar

2. Verrerie et appareillage

- ❖ Verrerie:
 - Erlenmeyer de 1000 ml .
 - Flacons stériles de 200 ml.
 - Lame et lamelle en verre .
 - Pipette pasteur .
 - Tubes stériles .
- ❖ Autres matériels et Produits chimiques :
 - Boîtes Pétri
 - Anse de platine
 - Portoirs
 - Barreau magnétique
 - Seringue stérile
 - Huile d'immersion
 - Cristal violet
 - Lugol
 - Alcool et fuchsine

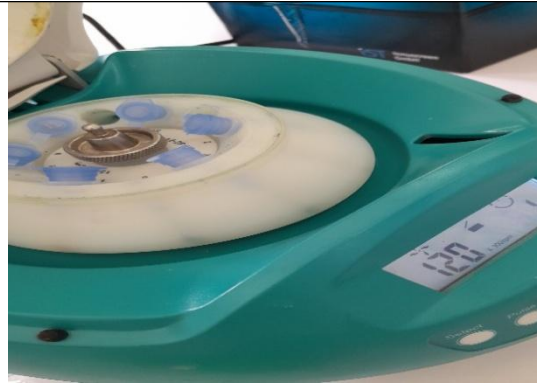
Annexe 3

Les étapes de l'extraction d'ADN

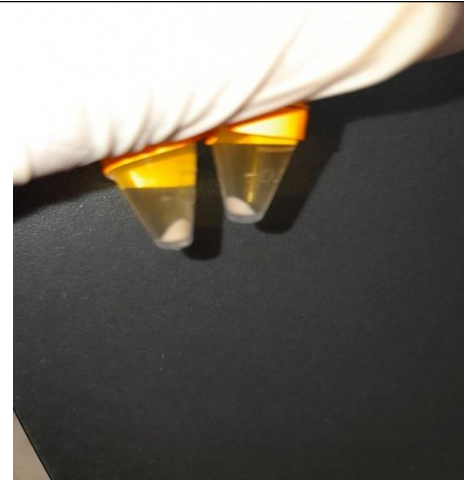
Le kit innu PREP Bacteria DNA (analytik jena) a été utilisé pour extraire l'ADN, conformément aux conditions fournies par le fournisseur.

a. Préparation des cellules

mettre en culture les souches dans 5 ml de MRS bouillon (laisser croître jusqu'à atteindre une densité optique de 1,3 à 2.



Centrifuger pendant 3 min à 12000 rpm et pendant 5 minutes



Jeter surnageant et garder le culot.

b. Rinçage

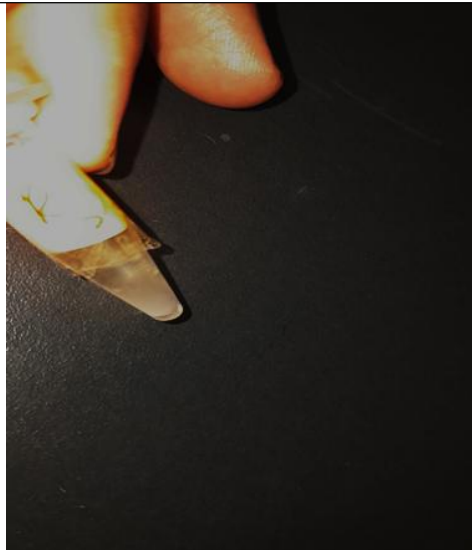
le culot resuspendue dans 200ul le tampon TE (tris EDTA 0.1X) dans un Eppendorf.



Vortex pendant 5 seconds.

Les cellules bactériennes ont été recueillies dans Eppendorf.

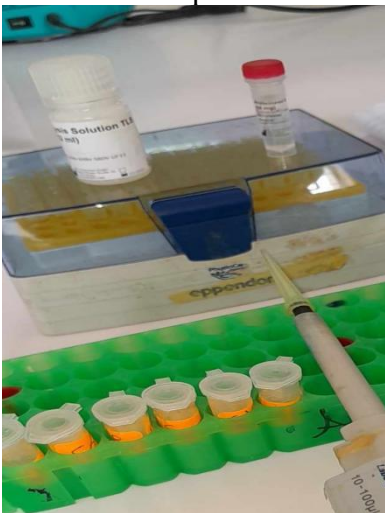
c. Mis en suspension



Addition 200 μ l de TE

d. Lyse des cellules

- Ajouter 15 μ l de lysozyme (10mg/ml) - Vortex 5 sec
- Incuber à 37°C pendant 15 min
- Ajouter 200 μ l TLS et 25 μ l PK
- Incuber 50°C pendant 15 min



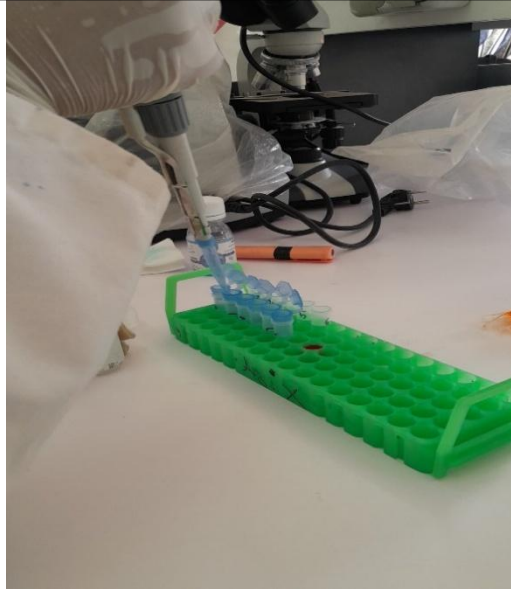
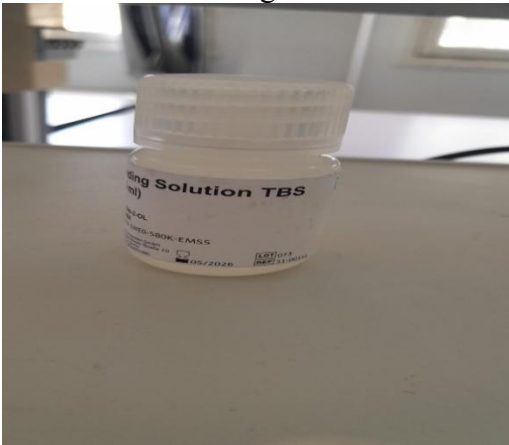
Centrifuger 10,000 pendant 1 min à 4°C.



Transférer dans les Eppendorf

e. Purification de l'ADN

- Ajouter 400 μ l de TBS
- Vortex 5 sec afin d'obtenir une suspension homogène



Centrifuger à 10000g pendant 2 min jusqu'à Passage complète de la solution à filtre

f. Rinçage de l'ADN Poser le filtre appliqué sur un nouveau tube



Addition 500 μ l HS nouveau tube

- centrifuger 1000 g/ 1 min
- Addition 750 μ l MS
- Centrifuger 10,000g/1min

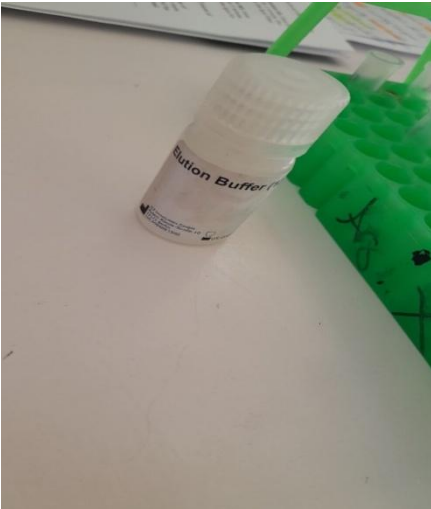
g. Retirer éthanol Poser le filtre appliqué sur un nouveau tube



Centrifugation max pendant 2 min

h. Elution

- 75 µl de tampon d'élution ont été ajoutés au Center de la membrane de la colonne de purification afin D'éluer l'ADN
- Incuber 1 min à la température ambiante



Centrifuger 60,000/1min afin de Précipiter l'ADN

La conservation doit être à 4°C, tandis que, la conservation du long duré doit être impérativement à -20°C.

Résumés

Résumés

Au cours de cette étude, six isolats de bactéries lactiques ont été obtenus à partir d'échantillons de lait de différentes races de chèvres de la région de Biskra. L'objectif principal était d'évaluer les polymorphismes génétiques de ces isolats en utilisant des marqueurs moléculaires RAPD-PCR. Les résultats ont révélé un taux de polymorphisme particulièrement élevé, soulignant l'impact significatif des variations régionales et des types de chèvres sur la diversité génétique des bactéries lactiques. L'utilisation des marqueurs RAPD-PCR, notamment les amorces M13 et 1254, a permis de mettre en évidence une grande variation génétique parmi les isolats étudiés, malgré le nombre limité d'échantillons analysés.

Mots clés:

Bactérie lactique, diversité, ADN, RAPD-PCR, marqueurs moléculaires

During this study, six isolates of lactic acid bacteria were obtained from milk samples of different goat breeds from the Biskra region. Our main objective was to assess the genetic polymorphisms of these isolates using RAPD-PCR molecular markers. The results revealed a particularly high polymorphism rate, highlighting the significant impact of regional variations and goat breeds on the genetic diversity of lactic acid bacteria. The use of RAPD-PCR markers, especially primers M13 and 1254, demonstrated substantial genetic variation among the studied isolates despite the limited number of samples analyzed.

Keywords:

Lactic acid bacteria, diversity, DNA, RAPD-PCR, molecular markers

خلال هذه الدراسة، تم الحصول على ستة عزلات من البكتيريا اللبنية من عينات حليب لأنواع مختلفة من الماعز من منطقة بسكرة. هدفنا الرئيسي هو تقييم التعدد الأشكالي الوراثي لهذه العزلات باستخدام علامات RAPD-PCR الجزيئية. كشفت النتائج عن معدل تعدد أشكال مرتفع بشكل خاص، مما يبرز التأثير الكبير للتنوعات الإقليمية وأنواع الماعز على التنوع الوراثي للبكتيريا اللبنية. أظهر استخدام علامات RAPD-PCR، وخاصة البادئات 13M و 1254، تنوعاً وراثياً كبيراً بين العزلات المدروسة على الرغم من العدد المحدود للعينات التي تم تحليلها.

الكلمات الرئيسية:

البكتيريا اللبنية، التنوع، الحمض النووي، RAPD-PCR، العلامات الجزيئية