



# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

RIGHI Ibtissem

TALBI Sana

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

## Mise en évidence de l'activité protéolytique par électrophores SDS- PAGE des souches de bactéries lactiques isolées du lait de brebis

### Jury :

Titre	Ben Harzallah Naouel	MCA	Université Mohamed khider, Biskra	Président
Titre	Chekara Bouziani Mohammed	MAA	Université Mohamed khider, Biskra	Rapporteur
Titre	Zarouel Samir	Grade	Université Mohamed khider, Biskra	Examineur

Année universitaire : 2023/2024

## Remerciements

*Au terme de ce travail nous tenons à remercier tout d'abord ALLAH (DIEU) le tout puissant, le clément, la miséricordieux, pour nous avoir donné la chance la volonté et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout, nous souhaitons qu'il nous montre d'autres jours meilleurs.*

*Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Microbiologique, Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, département des sciences de la nature et de la vie, Université, Mohamed kaiser de Biskra.*

*Nous adressons d'abord un grand remerciement à l'encadreur Mr. CHEKARA BOUZIANI Mohammed pour toute l'énergie qu'il ont dépensé pour l'encadrement au quotidien de nos travaux de mémoire, pour leurs Aide leurs disponibilités, leur dévouement et patience à notre égard. Nous remercions également Mme. BenHarzallah Naouel d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Mr. Zerouel Samir, votre venu en tant qu'examinateur nous honore, nous vous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos vifs remerciements.*

*Un très grand merci, à l'ensemble du personnel du laboratoire et tous les employeurs de l'université Mohamed khider de Biskra. Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicaces

*Tout d'abord, el hamdolillah ; m'a orienté vers le droit chemin le long de mon travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.*

*A' ma chère maman ILOURMANE Fadila.*

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne, mon parcours et qu'était mon ombre toutes les années de mes études ,et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.*

*A mon cher Papa RIGHI Moussa*

*Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et tout les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être et tu m'as toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin .*

*A mes adorables sœurs : Hana et Imane et Sereine*

*A mes petits frères : Abdellah et Mahdi .*

*À mon amie Mounia avec laquelle j'ai partagé tous les bons moments de mon cursus .*

*Merci infiniment pour ta sympathie, tes conseils et ton soutien constant.*

*À tous ( es ) mes amis ( es )*

*À tous ceux qui m'aiment ,*

*À tous ceux que j'aime ,*

*A tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui ont une place dans mon cœur .*

*Je dédie ce modeste travail ...*

**IBTISSEM**

## Dédicaces

*Tout d'abord, el hamdolillah ; m'a orienté vers le droit chemin le long de mon travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.*

*À ma chère maman OMRANI Fatma*

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne, mon parcours et qu'était mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.*

*Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude pour ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir,*

*À mon cher Papa TALBI Ahmed*

*Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et tout les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être et tu m'as toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin.*

*Puisse Dieu vous bénisse et vous protège.*

*À mes grand frère TALBI Idris.*

*À mes petites frère Housseem et Oussama.*

*À mon cher oncle AMRANI Rashid le seul qui m'encourage toujours à avances, qui Dieu vous protège.*

*À mes soeurs et amies : Loubna loubna . Hebat Allah, Manal, Nada et Ibtissam, Elham, Safwa.*

*Je dédie ce modeste travail...*

**SANA**

# Sommaire

## Table des matières

### Remerciements

### Dédicaces

### Liste des tableaux

### Liste des figures

### Liste des abréviations

### Introduction.....01

## Partie bibliographique

### Chapitre 1

I.	Lait de brebis.....	02
II.	Bactéries lactiques.....	02
1.	Définition et Caractéristiques.....	02
2.	Habitat.....	02
3.	Classification des Bactéries Lactiques.....	03
3.1.	Classification Classique.....	03
3.2.	Classification Moléculaire.....	03
4.	Évolution de la Taxonomie des Bactéries Lactiques.....	03
5.	Groupes des Bactéries Lactiques.....	04
6.	Utilité technologique des bactéries lactiques.....	05
7.	Activités protéolytiques et peptidasiques des bactéries lactiques.....	05

## Partie expérimentale

### Chapitre 02 : Matériel et méthodes

1.	Objectifs.....	07
2.	Matériel et Réactifs.....	07
3.	Méthodes.....	07
3.1.	Echantillonnage.....	07
3.2.	Préparation des échantillons, Isolement des bactéries lactiques.....	07
3.3.	purification des bactéries lactiques.....	08
3.4.	Caractérisation.....	08
3.4.1.	Test catalase .....	08
3.4.2.	Caractérisation macroscopique.....	08
3.4.3.	Caractérisation microscopique et coloration de Gram.....	09
3.4.4.	Caractérisation physiologique.....	09
a .	Test de croissance à 10 ° C et à 45 ° C.....	09
b .	Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl.....	09
c .	Test de thermo résistance.....	09
3.4.5.	Caractérisation Biochimique.....	09
3.5.	Conservation des souches.....	09
3.6.	Etude de l'activité protéolytique par SDS – PAGE.....	09
3.6.1.	Préparation des échantillons.....	09
3.6.2.	Technique d'électrophorèse SDS - PAGE ( Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis ).....	10
a.	Montage des plaques et préparation des gels.....	10

b. Dépôt des échantillons et migration .....	10
c. Démoulage et coloration .....	11

### **Chapitre 03 :Résultats et discussion**

<b>Résultats.....</b>	<b>13</b>
1. Caractérisation macroscopique et microscopique .....	13
1.1. Caractérisation macroscopique.....	13
a. Sur milieu solide.....	13
b. Sur milieu liquide.....	13
1.2. Caractérisation microscopiques (coloration de Gram).....	13
2. Réaction de catalase .....	14
3. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats.....	15
4. Etude de l'activité protéolytique des isolats lactiques par SDS – PAGE.....	16
<b>Discussion .....</b>	<b>18</b>
<b>Conclusion</b>	
<b>Références</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Composition chimique du lait de brebis (Balthazar et al. 2017).....	02
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques physico-chimiques de lait brebis résumée dans le tableau suivant :(F.A.O.1995).....	02
<b>Table 03 :</b> Matériel et Réactifs Utilisés.....	07
<b>Tableau:04.</b> Résultats de l'examen microscopique, coloration de gram et le test catalase des isolats lactiques.....	14
<b>Table05.</b> Caractérisation biochimique des isolats.....	15
<b>Tableau06.</b> Les activités protéolytiques des isolats testés.....	17

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques(Holzapfel et al., 2001).....	04
<b>Figure 02</b> : Utilisation des protéines des peptides et des acides amine et des acides aminés par les bactéries lactiques.....	05
<b>Figure 03</b> : Métabolisme protéolytique des bactéries <i>lactiques</i> (Benkrizi, 2019).....	06
<b>Figure 04</b> . préparation des dilutions et isolement des souches .....	08
<b>Figure 05</b> . Techniques de préparation d'Échantillon .....	10
<b>Figure 06</b> . Montage et dépôt des échantillons.....	10
<b>Figure07</b> . Dépôt des échantillons.....	11
<b>Figure08</b> . .Lancement de migration électrophorétique . .....	11
<b>Figure09</b> . Démoulage et coloration.....	12
<b>Figure10</b> . Observation macroscopique des colonies de l'isolatS1 cultivée sur milieu solide MRS.....	13
<b>Figure11</b> .la croissance des souches lactiques sur milieu MRS et M17 liquide.....	13
<b>Figure12</b> . Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram (×100).....	14
<b>Figure13</b> . Résultat négatif du test catalase.....	14
<b>Figure14</b> . Profils électrophorétiques des isolats S1-S11 par SDS-PAGE.....	16
<b>Figure15</b> . Profils électrophorétiques des isolats S12-S21 par SDS-PAGE.....	17

### Liste des abréviations

**°D**: degré Dornic

**MRS** : Gélose de Man Rogosa et Sharpe

**HCl**: Chlorure d'hydrogène (acide chlorhydrique)

**UHT**: Ultra Haute Température

**Tris**: hydroxyméthyl aminométhane

**APS**: Solution d'ammonium peroxydisulfate

**TCA**: Acide Trichloroacétique

**T**: Quantité totale d'acrylamide dans le gel

**C**: Maillage du gel

**TEMED**: tétra-méthyl-éthylènediamine

**pH**: potentiel hydrogène

**U** : unité

**°C** : degré Celsius

**cm, ,** : centimètre,

**g, kg** : gramme, kilogramme

**kcal**: kilocalorie

**h** : heure

**L, mL, µL** : litre, millilitre, microlitre

**min** : minutes

**s** : seconde

**V**: volt

**v/v**: volume par volume

**ARNr** : acide ribonucléique ribosomique

**ATP** : adénosine triphosphate

**ADN** : Acide DéoxyriboNucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**dNTP** : Déoxyribonucléotides Triphosphate

**PCR**: Polymérase Chain Reaction

**C**: cytosine

**G**: guanine

**NH<sub>2</sub>**: groupement amine

**TNBS**: Trinitrobenzenesulfonic Acide

**SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

**SDS** : Sodium Dodecylsulfate

# **Introduction**

# Introduction

Le projet de fin d'étude porte sur la mise en évidence de l'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques isolées du lait de brebis, un domaine d'étude crucial dans le cadre des applications technologiques et industrielles des bactéries lactiques. Outre leur capacité à acidifier le milieu et produire des polysaccharides et des bactériocines, les bactéries lactiques sont également reconnues pour leur activité protéolytique. Cette dernière joue un rôle essentiel dans la transformation du lait en générant des acides aminés à partir des caséines, les principales protéines laitières (Savijoki et al., 2006).

En favorisant l'augmentation des protéines solubles et de leurs dérivés dans le milieu, les bactéries lactiques stimulent la croissance microbienne et contribuent à la formation de composés aromatiques, renforçant ainsi leur importance dans les processus de fermentation et d'affinage des produits laitiers (Savijoki et al., 2006). C'est particulièrement pertinent dans le contexte de la production de peptides courts et d'acides aminés précurseurs, molécules cruciales pour le développement d'arômes et de saveurs caractéristiques.

La recherche de souches bactériennes présentant une activité protéolytique spécifique, et leur manipulation pour des applications industrielles, est un sujet d'intérêt croissant parmi les chercheurs, surtout lorsqu'appliqué à divers types de lait et de produits laitiers, incluant le lait de brebis. Ce dernier se distingue par sa composition nutritionnelle riche en protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux, le plaçant comme un bioproduit de haute qualité nutritionnelle malgré les conditions souvent modestes dans lesquelles les brebis sont élevées traditionnellement.

Dans cette perspective, notre projet s'est fixé comme objectif d'isoler et d'identifier le maximum de souches bactériennes lactiques du lait de brebis présentant une activité protéolytique par méthode électrophorétique SDS-PAGE. L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Mohamed Khider de Biskra.

# **Partie bibliographique**

# Chapitre 1

## I. Lait de brebis

Le lait de brebis désigne la sécrétion mammaire obtenue par traite et destinée à la consommation directe ou à des traitements ultérieurs, sans modification de sa composition de base (Balthazar et al., 2017; Bousselmi & Othmane, 2015; Hilali et al., 2011). En termes de composition, il est principalement constitué d'eau, de matières grasses, de protéines, de lactose, de minéraux, de vitamines et de solides totaux, comme détaillé dans le tableau 1 (Balthazar et al., 2017).

Selon les recherches, le lait de brebis présente diverses propriétés physico-chimiques, citées ci-dessous, conformément aux normes de la FAO (1995) :

**Tableau 1.** Composition chimique du lait de brebis (Balthazar et al. 2017)

Paramètre /Lait	Lait de brebis
Teneur en eau (g/kg)	829 ± 14
Matières grasses (g/kg)	59 ± 3
Lactose (g/kg)	48 ± 4
Protéines (g/kg)	55 ± 11
Caséines (g/kg)	47 ± 5
Cendres (g/kg)	9 ± 1

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques de lait brebis résumée dans le tableau suivant : (F.A.O.1995)

Constantes	Brebis
Energie (kcal/litre)	1100
Densité du lait entier à 20 °C	1,034 - 1,039
Point de congélation (°C)	-0,570
PH à 20 °C	6,50-6,85
Acidité titrable (°Dornic)	22-25
Tension superficielle du lait entier à 15 °C (dynes/cm)	45-49
Conductivité électrique à 25 °C (siemens)	
Indice de réfraction	1,33-1,40
Viscosité du lait entier à 20 °C (centipoises)	2,86 - 3,93

Ces caractéristiques définissent le profil unique du lait de brebis, influençant ses applications dans l'industrie alimentaire et la production de produits laitiers spécialisés (FAO, 1995).

## II. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, un groupe diversifié de micro-organismes Gram-positif, sont largement reconnues pour leurs applications variées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Elles jouent un rôle crucial en tant que cultures starters dans la production de produits laitiers et dans les fermentations végétales, contribuant ainsi à la production de produits chimiques et pharmaceutiques (Sadi et al., 2017).

### 1. Définition et Caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram-positif, souvent en forme de bâtonnets ou de cocci, catalase négatives, qui utilisent les glucides comme source principale de carbone. Elles comprennent plus de 12 genres différents, parmi lesquels les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus*. Ces micro-organismes sont essentiels dans les fermentations alimentaires, contribuant à améliorer l'arôme et la texture des produits finis (Molecule, 2017; Wang et al., 2021; Yao et al., 2009; Drouault et al., 2000).

Les bactéries lactiques présentent des caractéristiques morphologiques variées en termes de taille, forme et couleur, cruciales pour comprendre leur structure et leur organisation cellulaire (Zhen et al., 2021). Elles se distinguent également par leur profil enzymatique diversifié, leur capacité à fermenter différents sucres et leur production de métabolites spécifiques, ce qui influence directement leurs applications industrielles (Zhen et al., 2021).

## 2. Habitat

Les bactéries lactiques se trouvent dans divers milieux naturels, y compris les muqueuses humaines et animales, telles que le tube digestif, la cavité buccale, les voies respiratoires et la cavité vaginale. Elles colonisent également des environnements tels que les produits laitiers, la viande et les végétaux (Klaenhammer et al., 2002; Kleerebezem et Hugenholtz, 2003; El-Aidy et al., 2015). En outre, les bactéries lactiques ont été trouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, bien avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. Des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni et al., 2001).

Les bactéries lactiques habitent de nombreux milieux naturels, incluant les végétaux (plantes et fruits), les animaux et les humains (cavités buccales et vaginales, fèces, et le lait). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux, qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Sandine, 1988).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et des levains artisanaux (Jones, 1978). Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, les ensilages, le levain et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. sanfranciscensis*) (Demazeaud, 1996).

## 3. Classification des Bactéries Lactiques

Pour fournir une classification détaillée des bactéries lactiques, il est essentiel d'examiner à la fois les approches classiques et modernes utilisées dans leur identification et leur classification. Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe diversifié de micro-organismes Gram-positif qui jouent un rôle crucial dans divers secteurs industriels tels que l'alimentation, la fermentation, et la santé.

### 3.1. Classification Classique

La classification classique des bactéries lactiques repose principalement sur des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques observables. Cette approche traditionnelle a été développée par Orla-Jensen dès 1919 et repose sur plusieurs critères clés :

- **Forme Morphologique** : Les bactéries lactiques peuvent être des cocci (sphériques) ou des bâtonnets. Par exemple, les genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* sont souvent en forme de cocci, tandis que *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont généralement en forme de bâtonnets (de Roissart et Luquet, 1994; Orta-Jensen, 1919).

- **Mode de Fermentation** : La capacité des bactéries à fermenter différents sucres et à produire des métabolites tels que l'acide lactique est un critère important. Les bactéries homofermentaires produisent principalement de l'acide lactique à partir du glucose, tandis que les bactéries hétérofermentaires produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'alcool et du dioxyde de carbone (de Roissart et Luquet, 1994; Orta-Jensen, 1919).

- **Caractéristiques Physiologiques** : Elles incluent des propriétés telles que la tolérance au pH, la croissance à différentes températures, et la capacité à survivre dans des conditions environnementales variées (de Roissart et Luquet, 1994).

### 3.2. Classification Moléculaire

La classification moléculaire des bactéries lactiques repose sur l'analyse de séquences d'ADN, en particulier les marqueurs comme l'ARN ribosomique 16S. Cette approche moderne permet une identification plus précise et une meilleure compréhension de la diversité génétique au sein des espèces de bactéries lactiques. Les techniques couramment utilisées incluent :

- **Séquençage de l'ARN 16S** : Il s'agit d'une méthode standard pour déterminer la phylogénie des bactéries lactiques en comparant leurs séquences d'ARN ribosomique. Cela permet de distinguer différentes espèces et de révéler les relations évolutives entre elles (Lahtinen et al., 2011).

- **PCR et Autres Marqueurs Moléculaires** : La PCR (Polymérase Chain Reaction) est utilisée pour amplifier des segments spécifiques de l'ADN des bactéries lactiques, facilitant ainsi leur identification rapide et précise (Pot, 2008).

#### 4.Évolution de la Taxonomie des Bactéries Lactiques

Au fil du temps, la taxonomie des bactéries lactiques a subi des révisions et des réorganisations importantes. Des avancées dans les techniques de séquençage et l'utilisation de nouveaux outils bioinformatiques ont permis de découvrir de nouvelles espèces et de clarifier les relations phylogénétiques entre elles. Par exemple, des études récentes ont identifié de nouveaux genres et ont contribué à reclassifier certaines espèces au sein de groupes taxonomiques plus précis (Hardie & Whiley, 1997).

La détermination du pourcentage de GC (guanine-cytosine) était la première méthode basée sur l'utilisation de l'ADN dans la taxonomie bactérienne (Vandamme et al., 1996). Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe phylogénétique ayant un contenu en GC de 50 % dans leur ADN. Plus précisément, le pourcentage de GC dans l'ADN varie de 34 à 46 % pour le genre *Lactococcus*, de 36 à 43 % pour le genre *Leuconostoc*, de 34 à 42 % pour le genre *Pediococcus*, et atteint 67 % pour le genre *Bifidobacterium*. Le genre *Lactobacillus* est caractérisé par une grande hétérogénéité avec un pourcentage de GC allant de 32 à 53 % (Novel, 1993). Bien que les bifidobactéries soient phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques, elles sont traditionnellement incluses parmi elles en raison de certaines caractéristiques communes, telles que la production d'acide lactique et leur utilisation dans les laits fermentés (Holzapfel et al., 2001).

L'analyse de l'ADN par des enzymes de restriction a également ouvert la voie à la comparaison directe des génomes, en particulier après électrophorèse en champs pulsés (Stackebrandt et al., 2002). Cette technique permet d'accéder à la connaissance génétique du chromosome, de mesurer sa taille et d'établir son profil de restriction. La comparaison de ces profils permet de classer les souches au sein de la même espèce ou de séparer différentes espèces (Carr et al., 2002).

Selon l'édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli, et l'Ordre des Lactobacillales, qui renferme trente-cinq genres répartis sur six familles : Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, et Streptococcaceae (Ludwig et al., 2009).

La figure ci-dessous illustre l'arbre phylogénétique consensus, établi à partir de l'analyse comparative des séquences du gène 16S, présentant les principaux groupes de bactéries lactiques caractérisées par un faible contenu en mol% de G+C dans leur ADN, ainsi que les bactéries Gram positives non liées, des genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

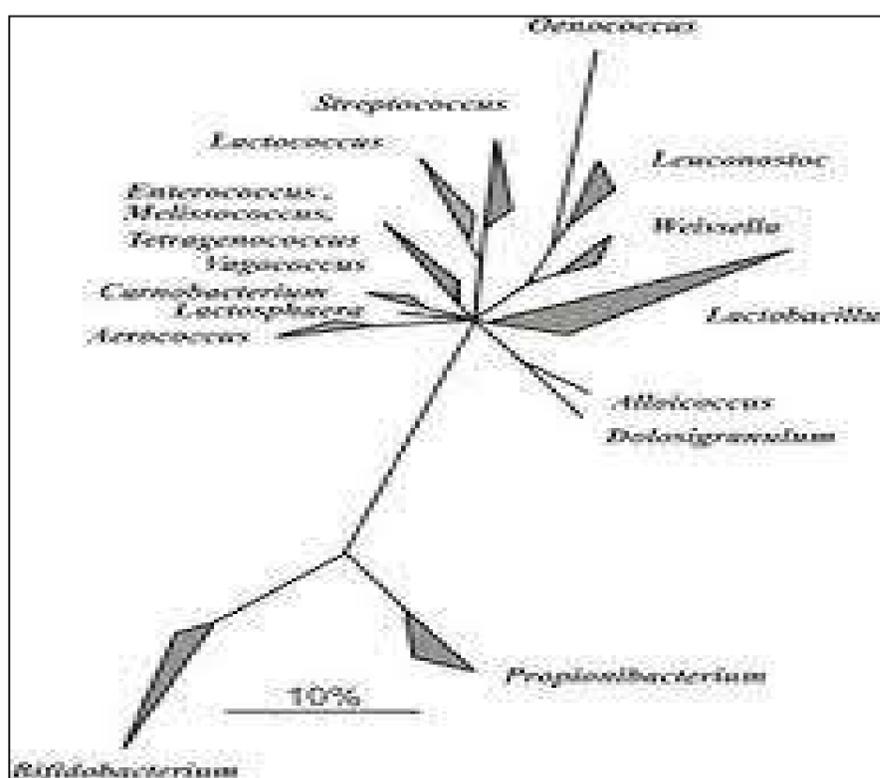


Figure 01 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001)

#### 5. Groupes des Bactéries Lactiques

Selon leur mode de fermentation, les bactéries lactiques sont classées en deux groupes principaux :

- Les bactéries homofermentaires produisent principalement de l'acide lactique à partir de sucres.
- Les bactéries hétérofermentaires produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'alcool et du dioxyde de carbone. (Mduziri P, M. 2017).

Actuellement, les bactéries lactiques comprennent treize genres bactériens différents, parmi lesquels on trouve notamment *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, et *Streptococcus* (Dortu & Thonart, 2008). Ces bactéries sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire en tant que cultures de départ, ou "starters", pour la production de produits fermentés tels que le yaourt, le fromage, le kéfir, la choucroute et les saucissons. Leur rôle dans ces processus est crucial, car elles contribuent non seulement à la fermentation et à la texture du produit final, mais

aussi à l'amélioration des caractéristiques organoleptiques, telles que le goût, l'arôme et la consistance. De plus, les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans l'augmentation de la durée de conservation des produits alimentaires fermentés. Elles produisent des substances antimicrobiennes, comme les bactériocines, qui inhibent la croissance des agents pathogènes et des microorganismes indésirables, contribuant ainsi à la sécurité et à la stabilité des aliments (Dortu&Thonart, 2008).

### 6. Utilité technologique des bactéries lactiques

La technologie de fabrication des produits fermentés joue un rôle crucial dans l'optimisation de l'activité des levains. Toutefois, même les meilleures technologies ne peuvent compenser l'absence d'un levain approprié. Le goût et l'arôme des produits fermentés sont largement influencés par l'acide lactique et les composés volatils produits par les bactéries lactiques. Par ailleurs, les polysaccharides exocellulaires produits par certaines souches de bactéries lactiques contribuent à la texture agréable et à la résistance aux traitements mécaniques des yaourts brassés et liquides (Driessen, 1988). La sélection de ferments capables de produire des exopolysaccharides en quantités et qualités adéquates est essentielle pour accroître la viscosité de produits tels que les yaourts brassés (Corrieu& Luquet, 2008).

L'impact des ferments sur la qualité des produits fermentés dépend fortement des souches utilisées. En effet, les activités et voies métaboliques varient entre les souches, influençant ainsi la qualité finale du produit (HylckamaVlieg&Hugenholtz, 2007). Les ferments sont utilisés principalement pour leur capacité à produire de l'acide lactique à partir du lactose, mais ils possèdent également d'autres fonctions importantes. Ils inhibent les micro-organismes indésirables, améliorent les propriétés sensorielles et rhéologiques, et apportent des bienfaits prouvés pour la santé.

Les ferments commerciaux comportent des souches choisies d'espèces prédéfinies ayant des propriétés métaboliques bien connues. L'introduction de ces ferments a considérablement amélioré la qualité commerciale et hygiénique des produits laitiers fermentés et a contribué à l'harmonisation des normes de qualité (Parente &Cogan, 2004).

### 7. Activités protéolytiques et peptidasiques des bactéries lactiques

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases liées à l'enveloppe cellulaire, d'un système de transport pour les acides aminés et les peptides, ainsi que de peptidases intracellulaires nécessaires à la dégradation des peptides du lait et des peptides dérivés des caséines en acides aminés (Roudj, 2011). L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à leur synthèse protéique implique un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements riches en protéines (Law &Haandrikman, 1997;Kamaly&Marth, 1998).

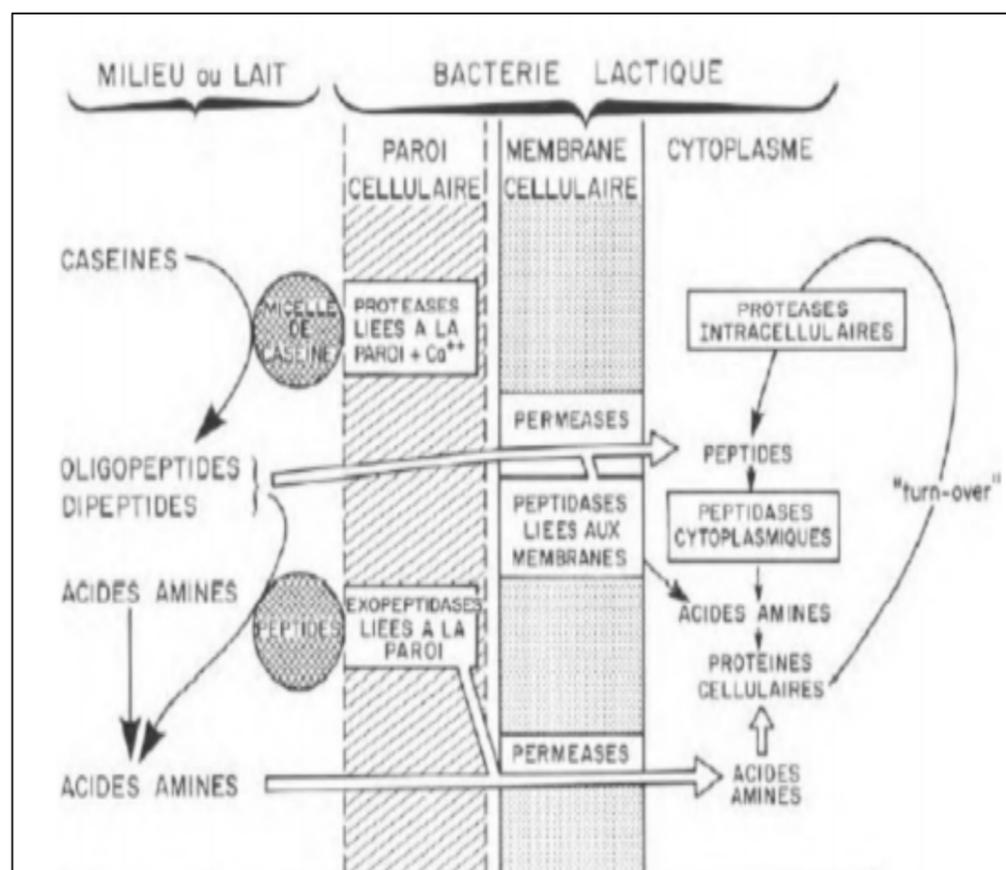


Figure 02 : Utilisation des protéines des peptides et des acides amine et des acides aminés par les bactéries lactiques.

Utilisation des protéines et des acides aminés par les bactéries lactiques(( Exterkate, 1976 ; Law et Sharpe, 1978)

Les bactéries lactiques possèdent des activités protéolytiques et peptidasiques cruciales qui déterminent leur capacité à utiliser la fraction azotée du milieu. Ces activités incluent l'action de diverses enzymes protéolytiques telles que des protéinases et des peptidases, qui décomposent les protéines en peptides et en acides aminés. Ces peptides et acides aminés jouent un rôle essentiel dans le développement des propriétés organoleptiques des produits fermentés, contribuant à la formation d'odeurs et de saveurs caractéristiques (Benkrizi, 2019). En outre, l'activité lipolytique des bactéries lactiques présente un intérêt particulier pour les applications fromagères (Beal et al., 2008).

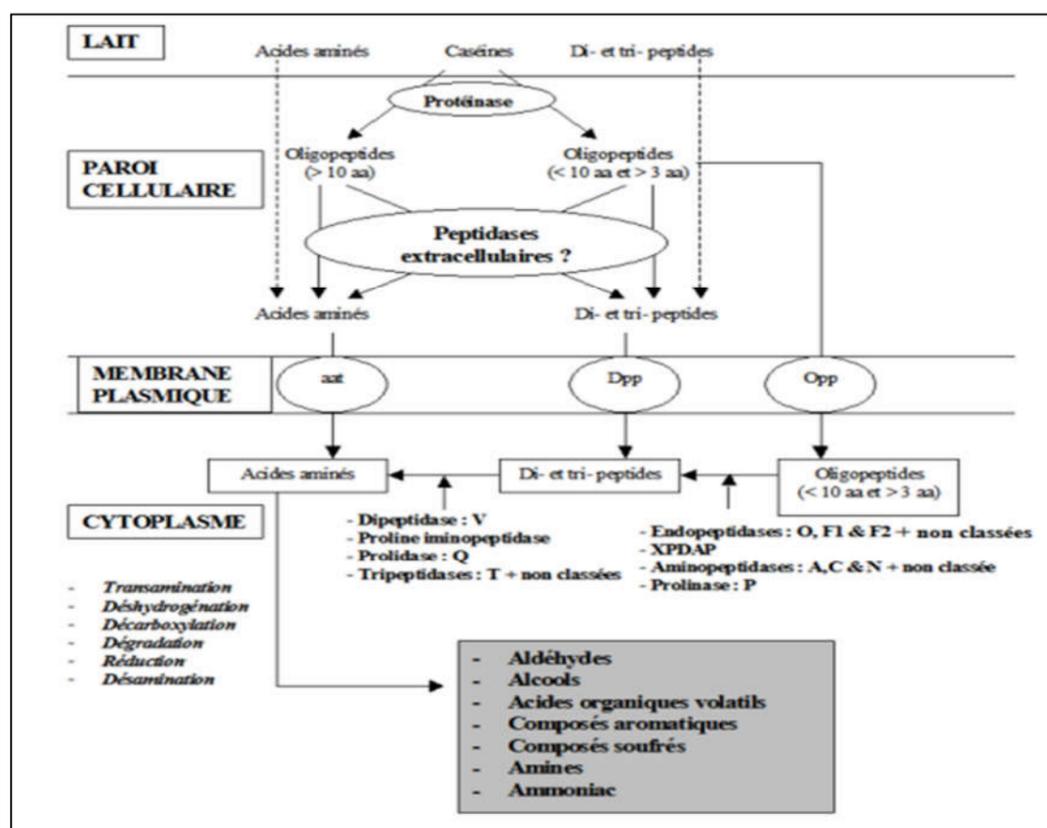


Figure 03 : Métabolisme protéolytique des bactéries lactiques(Benkrizi, 2019).

Pendant la fermentation, une étape cruciale dans la fabrication des produits fermentés, les bactéries lactiques améliorent les propriétés sensorielles des produits grâce à l'hydrolyse des protéines. Bien que ces bactéries aient généralement une faible activité protéolytique sur les protéines myofibrillaires, certaines souches comme *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus sakei* participent activement à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques, conduisant à la décomposition des peptides en acides aminés et améliorant ainsi la texture et la saveur des produits fermentés tels que les saucisses (Drosinos et al., 2007; Dalmiş et al., 2008; Scannell et al., 2004; Larrouture et al., 2000).

L'hydrolyse des protéines par les bactéries lactiques ne se limite pas seulement à l'amélioration des caractéristiques sensorielles des produits alimentaires, mais elle peut également avoir des implications sur la santé humaine. Certains peptides libérés au cours de la dégradation des protéines possèdent des propriétés bioactives, telles que des activités antihypertensives, antimicrobiennes et immunomodulatrices (Gobbetti et al., 2007; Korhonen & Pihlanto, 2006). Ces peptides bioactifs augmentent la valeur nutritionnelle des produits fermentés et offrent des bénéfices supplémentaires au-delà de la simple nutrition.

La capacité protéolytique des bactéries lactiques varie selon les espèces et les souches, ce qui permet une grande diversité dans les applications industrielles. Par exemple, *Lactobacillus helveticus* est particulièrement reconnu pour son activité protéolytique élevée, exploitée largement dans la production de fromages affinés (Savijoki et al., 2006). Les peptidases produites par ces bactéries hydrolysent les oligopeptides, générant des substances responsables des caractéristiques sensorielles des produits fermentés (Ammor et al., 2005; Papamanoli et al., 2003; Hughes et al., 2002).

Des études détaillées ont montré que certaines souches possèdent des enzymes spécifiques, comme la leucine-amino-peptidase (EC 3.4.11.1) présente dans toutes les souches, ainsi que l'arginine-amino-peptidase (EC 3.4.11.6) dans certaines souches, et la prolyle-dipeptidase (EC 3.4.13.8) capable d'hydrolyser de multiples dipeptides. En revanche, aucune activité de type carboxypeptidase (EC 3.4.12) n'a été trouvée (Desmazeaud et al., 1976). Les protéases de chaque souche ont été identifiées et mesurées sur la caséine radioactive 1 125, permettant un classement précis des souches entre elles (Desmazeaud et al., 1976).

Toutes les souches de *Streptococcus thermophilus* subissent l'électrophorèse en raison de l'hydrolyse importante des caséines  $\beta$  et  $\kappa$ , sans hydrolyse de la caséine  $\alpha$ S1. L'activité protéolytique globale, liée à la formation de groupes -NH<sub>2</sub> libres, a été fréquemment mesurée à l'aide de

réactifs comme la ninhydrine, l'oPA, et le TNBS. Les capacités protéolytiques des bactéries ont également été identifiées à l'aide de la chromatographie liquide haute performance, offrant ainsi un moyen précis de mesurer l'activité protéolytique (Bouton et al., 1993).

# **Partie expérimentale**

## **Chapitre 2**

### **Matériels et méthodes**

## Chapitre 03 : Matériel et méthodes

### 1. Objectifs

Les objectifs de cette étude se concentrent sur les points suivants :

- Isolement des souches bactériennes lactiques à partir du lait de brebis.
- Caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des isolats.
- Mise en évidence de l'activité protéolytique des isolats par la méthode électrophorétique SDS-PAGE.

### 2. Matériel et Réactifs

Pour mener à bien cette étude, une variété de matériel et de réactifs a été utilisée. Ce matériel et ces réactifs sont essentiels pour l'isolement, la caractérisation et l'analyse souches bactériennes lactiques. Le tableau suivant répertorie les éléments clés nécessaires à ces processus expérimentaux.

**Table 03 .** Matériel et Réactifs Utilisés

Appareillage et matériel	Milieux de culture	Verreries et consommable	Produits et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etuve (Mammert)</li> <li>• Bec bunsen</li> <li>• Bain marie (Mammert)</li> <li>• Agitateur chauffant (Arec)</li> <li>• Balance de précision</li> <li>• Micropipette P10, P100 et P1000</li> <li>• Réfrigérateur</li> <li>• Autoclave</li> <li>• Microscope optique</li> <li>• Microcentrifugeuse</li> <li>• PH mètre</li> <li>• Cuve d'électrophorèse verticale</li> <li>• Glacière isotherme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MRS gélose</li> <li>• MRS Bouillon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Béchers</li> <li>• Eprouvettes graduées</li> <li>• Tubes 'a essai</li> <li>• Flacons</li> <li>• Pipettes graduées</li> <li>• Micropipette</li> <li>• Pipettes pasteur</li> <li>• Entonnoirs</li> <li>• Boîtes de pétri</li> <li>• Seringues 5cc</li> <li>• Flacon 180 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acrylamide</li> <li>• Bisacrylamide</li> <li>• Tris Base</li> <li>• HCL</li> <li>• SDS</li> <li>• APS</li> <li>• TEMED</li> <li>• Acide</li> <li>• Trichloroacétique (TCA)</li> <li>• B-mercaptoéthanol</li> <li>• Bleu de coomassie</li> <li>• Tampon d'électrophorèse</li> <li>• NaCL</li> <li>• Violet de gentiane</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcool</li> <li>• Fuchsine</li> </ul>

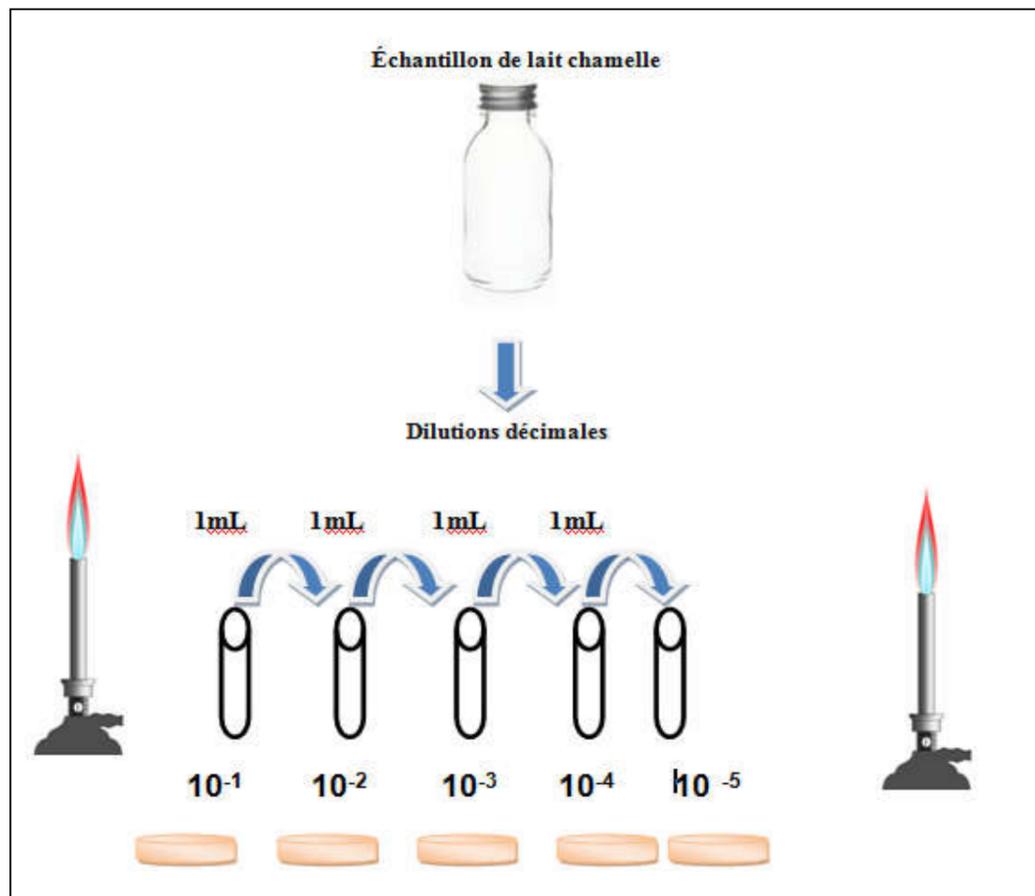
### 3. Méthodes

#### 3.1. Echantillonnage

L'échantillonnage du lait de brebis, provenant de différents sites : ZribetEloued, Leghrous, Sidi Okba et OuledDjalel, a été effectué au mois de mars. Les échantillons ont été recueillis dans des flacons et conservés à 4°C avant d'être transportés au laboratoire pédagogique du département de science de la nature et de la vie de l'université Mohamed Khider à Biskra pour y être analysés.

#### 3.2. Préparation des échantillons, Isolement des bactéries lactiques

Après homogénéisation des échantillons de lait, des dilutions décimales (de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) ont été réalisées dans de l'eau physiologique. À partir de chaque dilution, un volume de 100 µl a été pipeté, déposé et étalé en surface sur un milieu MRS solide. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 24 à 72 heures à 30°C.



**Figure 04.** Préparation des dilutions et ensemencement

### 3.3. Purification des bactéries lactiques

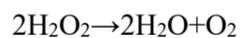
Selon Idoui et al. (2009), la purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose MRS, avec une incubation à 30°C pendant 24 heures, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, forme et couleur, indiquant la pureté des souches. Dans le présent travail, deux repiquages ont été effectués. Après une incubation à 30°C pendant 48 heures, les colonies ont été transférées dans du bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 24 heures (Guiraud, 2003).

### 3.4. Caractérisation

En raison de contraintes de temps et de ressources, les cellules isolées ont été soumises uniquement à des tests macroscopiques, microscopiques, physiologiques et biochimiques détaillés.

#### 3.4.1. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), un composé hautement toxique pour les cellules. Pour se protéger contre cette toxicité, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène grâce à des enzymes, notamment la catalase. La catalase catalyse la décomposition de l'eau oxygénée en eau et en oxygène selon la réaction suivant :



Cette réaction élimine le peroxyde d'hydrogène, réduisant ainsi les dommages potentiels aux cellules bactériennes (Madigan et al., 2012). La présence et l'activité de la catalase peuvent être détectées en ajoutant du peroxyde d'hydrogène à une culture bactérienne et en observant la formation de bulles d'oxygène, signe de la décomposition du  $H_2O_2$  (Todar, 2020).

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques (catalase négative) des entérobactéries (catalase positive). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de gaz ( $O_2$ ) (Bourgeois et al., 1980).

#### 3.4.2. Caractérisation macroscopique

L'observation des caractères cultureux des bactéries isolées permet de les identifier plus précisément. Les colonies qui sont blanches, rondes ou lenticulaires, bombées, laiteuses et crémeuses sont des indicateurs potentiels de la présence de bactéries lactiques. Cette caractérisation visuelle est une étape cruciale dans l'identification des souches bactériennes, car elle fournit des indices préliminaires sur leur nature et leur classification (Axelsson, 2004).

### **3.4.3. Caractérisation microscopique et coloration de Gram**

L'examen de préparation microscopique révélée par la coloration de Gram est utilisé pour classer les bactéries selon leur réaction de Gram, leur morphologie et leur mode d'association (Leveau et al., 1991).

La procédure commence par la fixation d'un frottis à la chaleur, qui est ensuite coloré pendant une minute avec du violet de gentiane. Le frottis est ensuite traité pendant une minute avec une solution de lugol avant d'être rincé à l'eau. La décoloration, une étape critique, est réalisée en traitant le frottis avec de l'éthanol à 95%. La lame est maintenue inclinée et le solvant est laissé couler sur le frottis pendant 2 à 3 secondes, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement. Le frottis est immédiatement rincé à l'eau, puis soumis à une contre-coloration avec de la fuchsine pendant 30 secondes. Après un bref rinçage, le frottis est séché avec un buvard et examiné au microscope à l'objectif à immersion (grossissement x 100) (Brooks et al., 2023).

### **3.4.4. Caractérisation physiologique**

#### **a . Test de croissance à 10 ° C et à 45 ° C**

La capacité des souches à se développer à des températures de 10°C et 45°C a été évaluée en inoculant deux tubes de milieu MRS avec chaque culture purifiée. Le tube incubé à 45°C est inspecté après une période de 24 à 48 heures, tandis que celui incubé à 10°C est examiné après une durée de 7 à 10 jours (Baron et al., 2021).

#### **b . Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl**

La croissance des souches est évaluée en inoculant trois tubes de milieu MRS, ajustés aux concentrations de 4 % et 6,5 % (p/v) de NaCl. Ces tubes sont ensuite incubés à 30°C pendant 24 heures (Baron et al., 2021).

#### **c . Test de thermo résistance**

Le test consiste à introduire 100 µl de pré-culture de chaque souche dans un tube de milieu MRS. Les tubes sont ensuite chauffés dans un bain-marie réglé à 60°C pendant 30 minutes. Après refroidissement sous un jet d'eau froide, les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures (Baron et al., 2021).

### **3.4.5. Caractérisation Biochimique**

La caractérisation biochimique des espèces de bactéries lactiques repose principalement sur leur capacité à fermenter les sucres glucose, galactose, lactose et saccharose. Pour établir ce profil fermentaire, les souches sont cultivées sur milieu MRS et incubées à 30°C pendant 24 heures. Après incubation, 5 ml de chaque culture sont centrifugés à 5000 xg pendant 5 minutes et lavés deux fois avec de la peptone saline. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans 1 ml de peptone saline. Cette suspension est utilisée pour ensemercer le milieu MRS contenant l'indicateur coloré le pourpre de bromocrésol (BCP), auquel ont été ajoutés 2 % des sucres précédemment mentionnés. Les cultures ainsi préparées sont recouvertes d'une couche d'huile de paraffine stérile pour assurer un environnement anaérobie. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. La fermentation des sucres est confirmée par un changement de couleur de l'indicateur, passant du violet au jaune (Guiraud, 2003).

### **3.5. Conservation des souches**

Les souches pures ont été conservées à court terme en les maintenant à 4°C dans des tubes à essai contenant du bouillon MRS. Un repiquage a été réalisé après une période de 15 jours pour assurer la viabilité des souches (Samelis et al., 1994).

### **3.6. Etude de l'activité protéolytique par SDS - PAGE**

La technique électrophorétique a été utilisée dans le but de confirmer l'activité protéolytique observée chez certains isolats. Cette confirmation a été réalisée en utilisant la méthode électrophorétique SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes.

#### **3.6.1. Préparation des échantillons**

Les souches isolées ont été réactivées dans des milieux bouillon MRS en les incubant à 30°C pendant 24 heures. Un mélange a été préparé en combinant 50 µL de la pré-culture (les souches) avec 500 µL de lait UHT écrémé de la marque "Candia", puis incubé à 30°C pendant 72 heures. Après l'incubation, 20 µL du mélange (pré-culture + lait UHT) a été ajouté à 160 µL de tampon échantillon ou tampon Laemmli (une solution pour solubiliser les protéines). Le mélange a été agité par vortex pendant 2 minutes, chauffé à 100°C pendant 3 minutes, puis laissé refroidir (Idoui et al., 2009).



**Figure 05.** Préparation des échantillons pour SDS-PAGE

### 3.6.2. Technique d'électrophorèse SDS - PAGE ( Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis )

#### Principe d'électrophorèse des protéines

L'électrophorèse vise à séparer des molécules chargées à travers un gel de polymère sous l'effet d'un champ électrique. En conditions dénaturantes, les gels de polyacrylamide sont constitués de deux gels de réticulations différentes superposés. Le premier gel, appelé gel de concentration ou "stacking gel," possède une faible réticulation (2,88 %), ce qui permet aux protéines de pénétrer facilement et de se concentrer à l'interface avec le second gel. Le second gel, connu sous le nom de gel de séparation, a une réticulation de 12,58 %, permettant une séparation efficace des protéines (Laemmli, 1970; Walker, 2017).

#### Technique

##### a . Montage des plaques et préparation des gels

La technique d'électrophorèse utilisée est basée sur celle proposée par Laemmli (1970), modifiée par Payne et al. (1994). Deux plaques de verre soigneusement nettoyées sont assemblées et leur étanchéité est vérifiée à l'aide d'eau distillée. Entre ces plaques, 7,5 ml de gel de séparation est versé. Ce gel est préparé avec 40 % d'acrylamide (p/v), 2 % de bisacrylamide (p/v), 10 % de SDS (p/v), et du Tris-HCl 1M tamponné à pH 8,8. Le gel de concentration est tamponné à pH 6,8. La polymérisation des gels est assurée par l'ammonium persulfate et le TEMED (Laemmli, 1970; Payne et al., 1994).



**Figure06 .** Montage des plaques

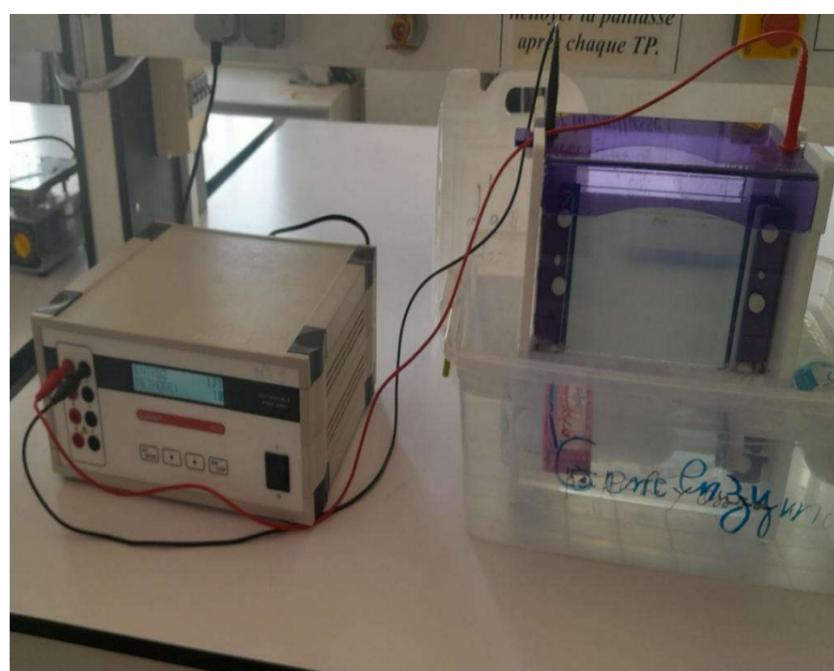
##### b. Dépôt des échantillons et migration

Une fois les gels polymérisés, le tampon de migration est ajouté dans les puits et la cuve. Ensuite, 15  $\mu$ L de chaque échantillon est déposé dans les puits. La cuve est fermée avec le couvercle porte-électrodes, les électrodes sont connectées au générateur, et le système est mis en marche. Les conditions de migration sont définies avec un voltage maximum de 1200 V, une intensité constante de 45 mA, et une durée

approximative de 4 heures (migration de jour). Pendant la migration, il est nécessaire de vérifier régulièrement le bon déplacement des bandes dans le gel en suivant le front de migration (Payne et al., 1994)



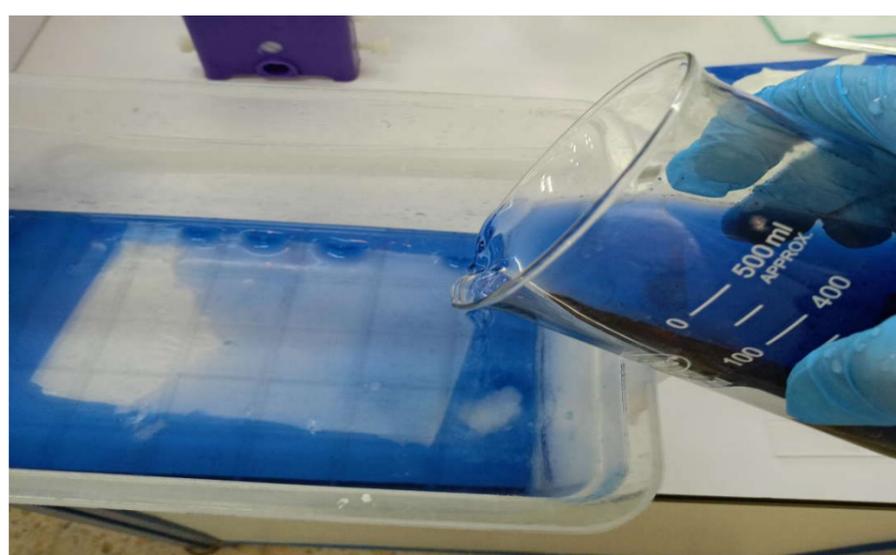
**Figure07 .** Dépôt des échantillons



**Figure08. .**Lancement de migration électrophorétique .

### **c. Démoulage et coloration**

À la fin de la migration, ouvrez le couvercle, retirez le bloc support et le gel d'électrophorèse. Éliminez le gel de concentration et récupérez le gel de séparation. Transférez ce dernier dans un bac de coloration rempli d'une solution de coloration. Le colorant utilisé est à base de bleu de Coomassie. Les protéines sont fixées dans une solution de TCA (acide trichloroacétique) à 60 % et de bleu de Coomassie R250 à 1 % (p/v) pendant 24 heures sous agitation. Ensuite, le gel est décoloré en le laissant dans l'eau du robinet pendant quelques jours (Payne et al., 1994).



**Figure09.** Démoulage et coloration

# **Chapitre 3**

**Résultats**

**et**

**discussion**

## Chapitre 04 : Résultats et discussion

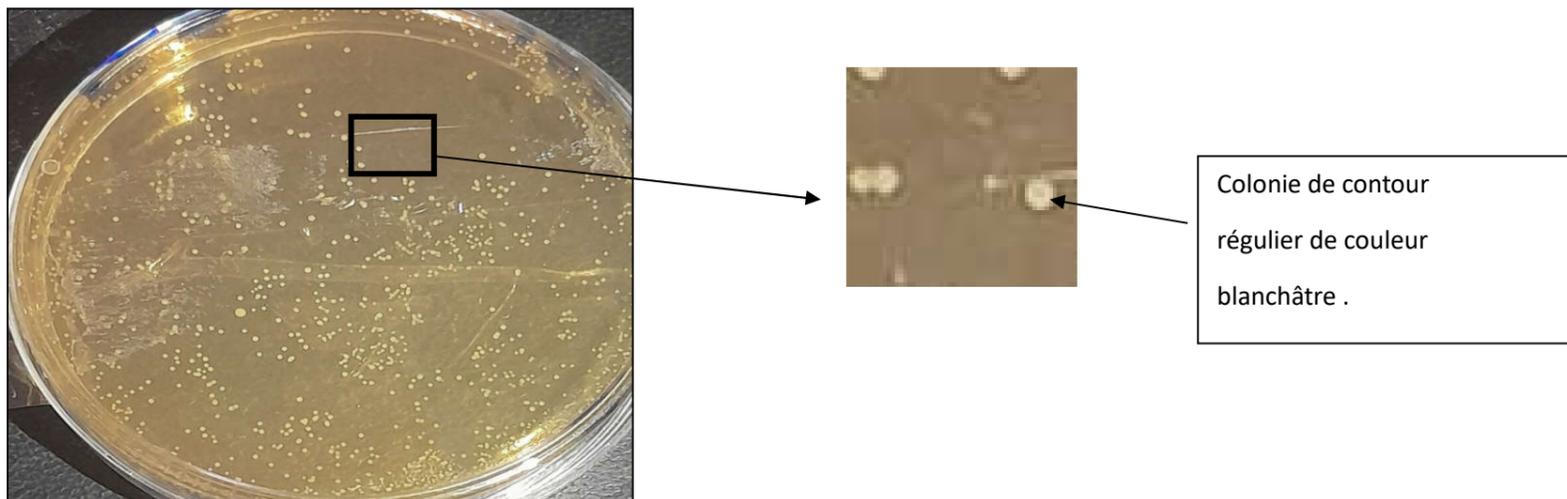
## Résultats

## 1. Caractérisation macroscopique et microscopique

## 1.1. Caractérisation macroscopique

## a. Sur milieu solide

La figure 2 présente l'aspect macroscopique des isolats S1 cultivées sur un milieu MRS. L'examen macroscopique des souches sélectionnées a révélé des colonies de petite taille, de forme arrondie et bombée, avec une surface lisse et une couleur blanchâtre. Ces colonies possèdent un contour régulier, indiquant une croissance homogène sur le milieu de culture.



**Figure10.** Observation macroscopique des colonies de l'isolat S1 cultivée sur milieu solide MRS.

## b. Sur milieu liquide

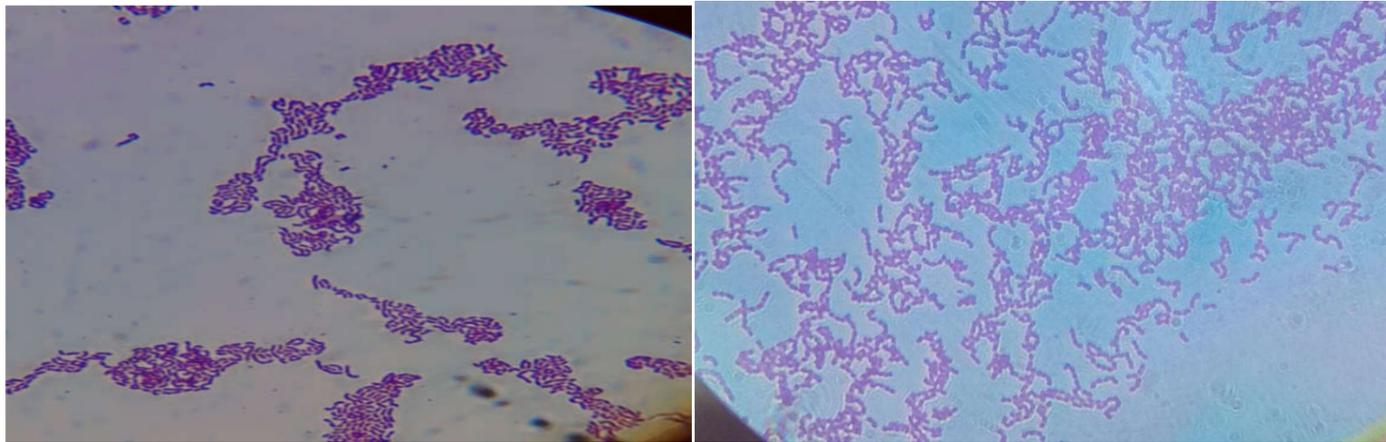
La croissance des bactéries dans le milieu MRS liquide se manifeste par l'apparition d'un trouble homogène ( Figure 11 )



**Figure11.** la croissance des souches lactiques sur milieu MRS et M17 liquide.

## 1.2. Caractérisation microscopiques (coloration de Gram)

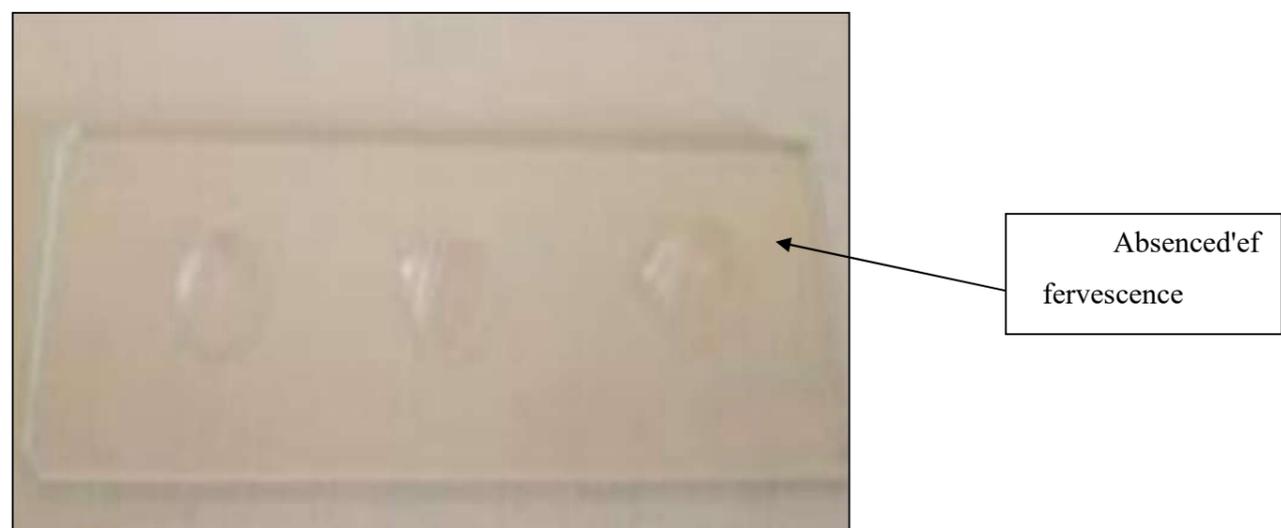
L'observation microscopique des isolats a révélé diverses morphologies cellulaires, comprenant des bacilles, des coccobacilles et des coques. Les coques se présentaient principalement en paires ou en petites chaînes, tandis que les bacilles observés étaient relativement courts. La figure montre l'observation microscopique de quelques souches sélectionnées, toutes caractérisées par une coloration Gram-positive, confirmant leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.



**Figure12.** Aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram ( $\times 100$ ).

## 2. Réaction de catalase

L'absence de bulles d'air après l'ajout d'une goutte de peroxyde d'hydrogène sur les colonies indique que toutes les souches sont catalase négative. Les résultats, illustrés dans la figure, montrent que ces souches appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif et catalase négative, caractéristiques des bactéries lactiques.



**Figure13.** Résultat négatif du test catalase

Les résultats de l'examen microscopique, coloration de gram et le test catalase sont réunis dans le tableau suivant.

Tableau:04. Résultats de l'examen microscopique, coloration de gram et le test catalase des isolats lactiques.

Isolats	Gram	Forme	Catalase
S1	+	Coccobacille	-
S2	+	Coccobacille	-
S3	+	Coccobacille	-
S4	+	Bacille	-
S5	+	Bacille	-
S6	+	Bacille	-
S7	+	Bacille	-
S8	+	Bacille	-
S9	+	Bacille	-
S10	+	Bacille	-
S11	+	Bacille	-
S12	+	Bacille	-
S13	+	Cocci	-
S14	+	Cocci	-
S15	+	Cocci	-
S16	+	Bacille	-
S17	+	Cocci	-
S18	+	Cocci	-
S19	+	Coccobacille	-
S20	+	Cocci	-
S21	+	Bacille	-

**3. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats**

La caractérisation physiologique et biochimique des isolats a été réalisée en étudiant leur comportement face à différents paramètres, tels que la croissance à différentes températures et en présence de concentrations variables de NaCl, ainsi que leur capacité à fermenter certains sucres. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessus.

Table05. Caractérisation biochimique des isolats

Souche	10°C	45°C	NaCl 4%	NaCl 6,5%	60°C/ 30min	Glu	Gal	Lac	Sac
S1	+	+	+	-	-	+	+	+	-
S2	+	-	+	-	-	+	-	+	+
S3	+	+	+	-	-	+	-	+	+
S4	+	-	-	-	-	+	+	+	-
S5	+	-	-	-	-	+	-	+	-
S6	+	-	+	-	-	+	-	+	-
S7	+	-	+	-	-	+	+	+	-
S8	+	-	-	-	-	+	+	+	-
S9	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S10	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S11	+	-	-	-	-	+	+	+	+
S12	-	-	+	-	+	+	-	+	-
S13	-	+	+	+	+	+	+	+	-
S14	-	+	+	+	+	+	+	+	-
S15	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S16	+	-	-	-	+	+	+	+	+
S17	-	+	-	-	+	+	+	+	-
S18	-	+	-	-	+	+	+	+	-
S19	+	+	-	-	-	+	+	+	-
S20	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S21	+	+	-	-	-	+	-	+	+

+ : Réaction Positive ; - : Réaction Négative ; Glu : Glucose ; Lac : Lactose ; Gal : Galactose ; Sac : Saccharose

Les résultats présentent des variations intéressantes qui peuvent être discutées en détail. Parmi les souches testées, certaines ont montré une capacité de croissance à des températures extrêmes, telles que S1, S3, S9 et S10, qui ont toutes poussé à la fois à 10°C et à 45°C. Cela suggère une adaptation à des conditions environnementales variables, ce qui pourrait être bénéfique dans des applications industrielles nécessitant une résistance à des températures fluctuantes.

En ce qui concerne la tolérance au sel, plusieurs souches ont montré une croissance en présence de concentrations élevées de NaCl, notamment S3, S7, S9, S10, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19 et S20, qui ont toutes poussé à 4% de NaCl. Parmi celles-ci, S9, S10, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19 et S20 ont également poussé à 6,5% de NaCl. Cette capacité de tolérance au sel peut être utile dans des environnements où le sel est présent en concentrations élevées, comme dans certaines industries alimentaires.

En ce qui concerne la fermentation des sucres, toutes les souches ont fermenté le glucose, indiquant une capacité à utiliser ce sucre comme source de carbone. Cependant, la fermentation du galactose et du saccharose était moins fréquente parmi les souches testées. Par exemple, seules

les souches S1, S3, S7, S9, S10, S16, S17, S18, S19 et S20 ont fermenté le galactose, tandis que seules les souches S1, S2, S3, S6, S7, S9, S10, S11, S16, S17, S18, S19 et S20 ont fermenté le saccharose.

4. Etude de l'activité protéolytique des isolats lactiques par SDS – PAGE

La séparation des protéines du lait chez le témoin révèle une composition complexe de diverses fractions protéiques organisées en quatre zones distinctes. Ces zones comprennent la pré-caséine  $\alpha$ S, les caséines ( $\alpha$  caséine S1,  $\alpha$  caséine S2,  $\beta$  caséine), la  $\gamma$  caséine, ainsi que les protéines sériques  $\beta$  lactoglobuline et  $\alpha$  lactalbumine (Leroy & De Vuyst, 2004 ; McSweeney, 2006).

Les figures suivantes montrent les profils électrophorétiques des 21 isolats analysés.

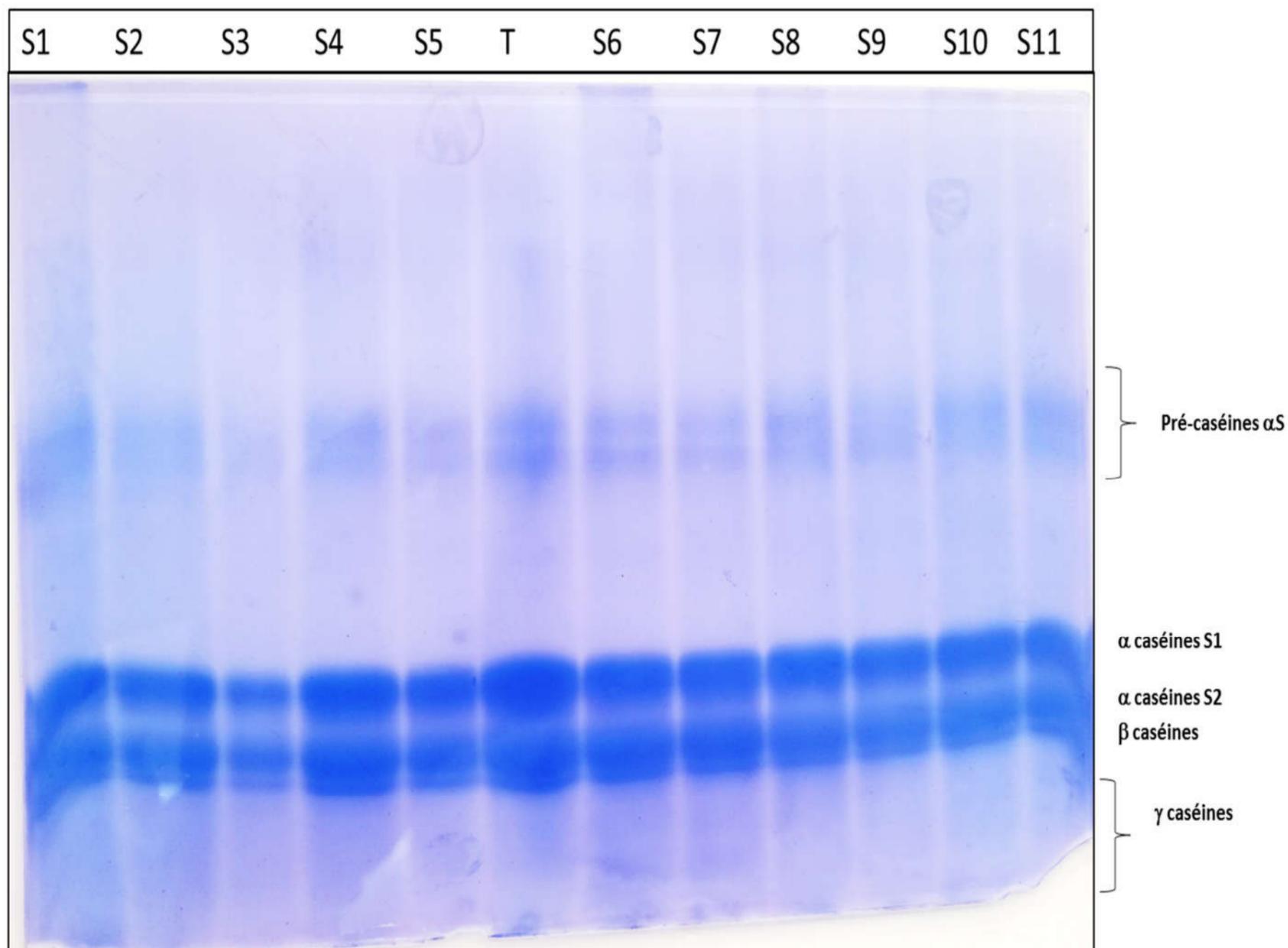


Figure14. Profils électrophorétiques des isolats S1-S11 par SDS-PAGE

Figure15. Profils électrophorétiques des isolats S12-S21 par SDS-PAGE

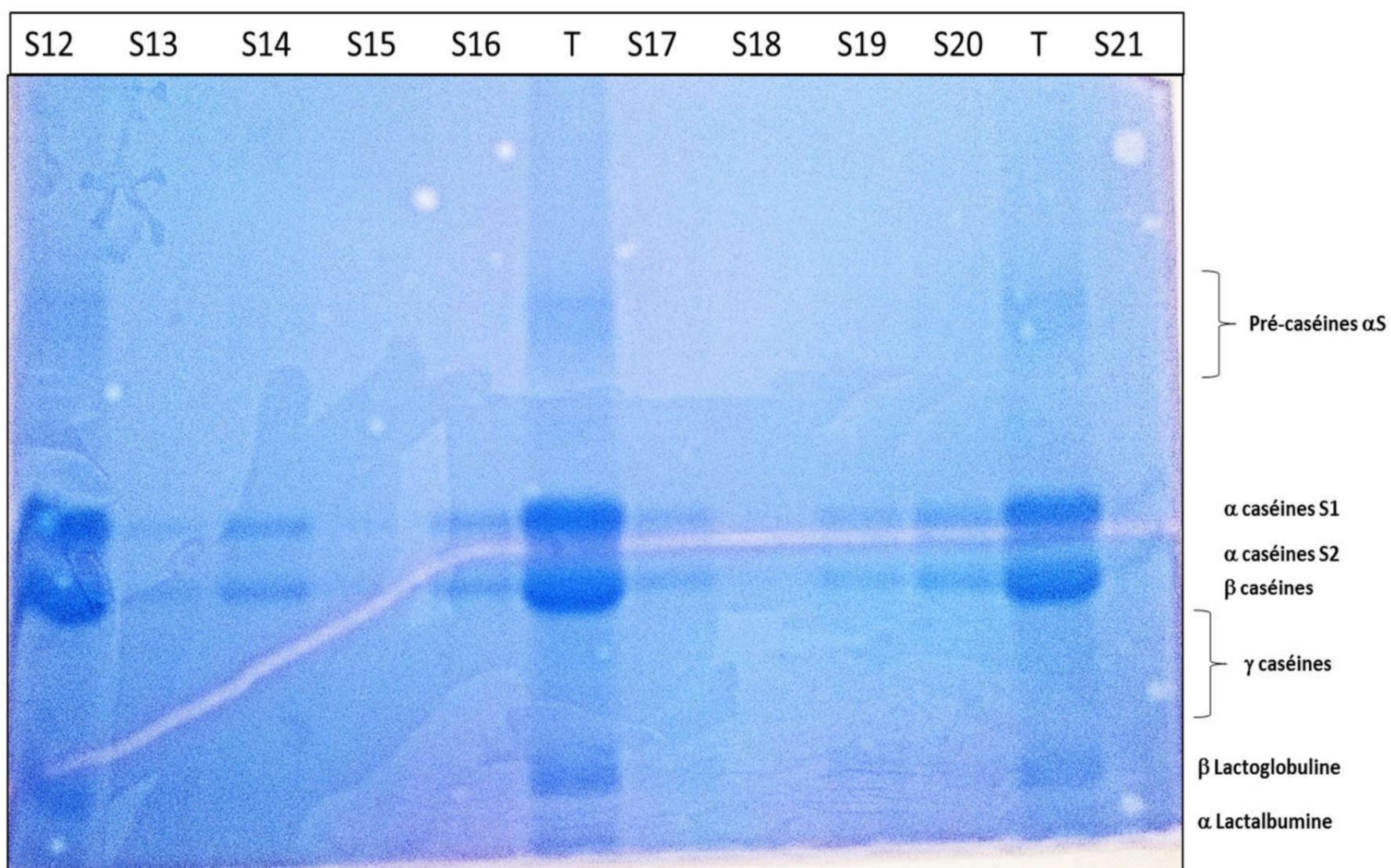


Figure15. Profils électrophorétiques des isolats S12-S21 par SDS-PAGE

Le tableau suivant résume les différentes activités trouvées chez les 6 isolats testés.

**Tableau06.** Les activités protéolytiques des isolats testés

Isolat	Activité protéolytique
S1	Aucune activité remarquable
S2	Faible activité $\alpha$ S pré-caséinolytique
S3	Aucune activité remarquable
S4	Aucune activité remarquable
S5	Aucune activité remarquable
S6	Aucune activité remarquable
S7	Aucune activité remarquable
S8	Aucune activité remarquable
S9	Aucune activité remarquable
S10	Aucune activité remarquable
S11	Aucune activité remarquable
S12	Aucune activité remarquable
S13	Forte activité de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S14	Activité moyenne de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S15	Activité totale de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S16	Activité moyenne de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S17	Forte activité de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S18	Activité totale de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S19	Forte activité de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S20	Activité moyenne de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique
S21	Forte activité de $\alpha$ S pré-caséinolytique ; S1 et S2 caséinolytique ; $\beta$ lactoglobulinolytique et $\alpha$ lactalbuminolytique

Les résultats de la recherche de l'activité protéolytique montrent une variabilité significative dans les activités protéolytiques des différents isolats testés :

**Absence d'activité protéolytique :**

La majorité des isolats, tels que S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11 et S12, n'ont montré aucune activité protéolytique remarquable. Cela pourrait indiquer que ces isolats ne possèdent pas ou possèdent très peu d'enzymes protéolytiques actives contre les fractions protéiques spécifiques testées.

**Faible activité protéolytique**

L'isolat S2 a montré une faible activité  $\alpha$ S pré-caséinolytique, ce qui pourrait suggérer une capacité limitée à dégrader les fractions  $\alpha$ S de la caséine.

### Activité protéolytique forte à totale

Les isolats S13, S17, S19 et S21 ont montré une forte activité protéolytique, capable de dégrader les fractions  $\alpha$ S pré-caséine, S1 et S2 caséine, ainsi que les protéines  $\beta$  lactoglobuline et  $\alpha$  lactalbumine. Cette activité élevée pourrait être due à une production plus abondante ou plus efficace d'enzymes protéolytiques.

Les isolats S15 et S18 ont montré une activité protéolytique totale pour les mêmes fractions, ce qui pourrait les rendre particulièrement intéressants pour des applications où une dégradation complète des protéines du lait est souhaitée.

### Activité protéolytique moyenne

Les isolats S14, S16 et S20 ont montré une activité protéolytique moyenne, suggérant une capacité intermédiaire à dégrader les fractions protéiques testées.

## Discussion

L'examen visuel des isolats de lait de brebis a révélé des colonies de petite taille, arrondies et bombées, avec une surface lisse et une couleur blanchâtre, caractéristiques couramment observées chez les bactéries lactiques isolées du lait. Ces colonies, avec un contour régulier et une croissance homogène sur le milieu de culture, suggèrent une pureté des isolats et une santé optimale des cultures bactériennes, cruciales pour des analyses précises et fiables. Ces observations sont en accord avec d'autres études similaires. Par exemple, Gonzalez et al. (2008) ont observé des colonies similaires, indiquant une bonne santé des cultures bactériennes. Fox et McSweeney (1998) ont montré que les bactéries lactiques du lait de brebis, avec une croissance homogène sur des milieux de culture, sont souvent plus viables et efficaces dans la fermentation laitière, ce qui est un indicateur de cultures pures et sans contamination. Leroy et De Vuyst (2004) ont souligné l'importance de la pureté et de la santé des cultures bactériennes pour la production de produits laitiers de haute qualité, indiquant que les colonies homogènes et régulières sont un signe de cultures optimales, capables de produire des métabolites bénéfiques et de réaliser une fermentation efficace.

La croissance des bactéries dans le milieu MRS liquide se manifeste par l'apparition d'un trouble homogène. Ce phénomène indique une distribution uniforme des cellules bactériennes en suspension, suggérant une prolifération active et équilibrée des bactéries dans tout le milieu. Le trouble homogène est caractéristique d'une culture bactérienne bien développée, où les cellules ont atteint une densité suffisante pour diffuser la lumière de manière uniforme à travers le liquide, reflétant ainsi leur croissance vigoureuse et homogène (Madigan et al., 2015; Todar, 2020).

Les résultats montrent que les isolats de lait de brebis présentent des formes variées, telles que bacilles, coccobacilles et coques, ainsi que des arrangements en paires ou en chaînettes. Ces morphologies sont caractéristiques des bactéries lactiques, notamment des lactobacilles et des streptocoques, comme rapporté par Axelsson (2004) et Hammes & Hertel (2009). La coloration Gram-positif observée chez ces isolats confirme leur classification comme bactéries lactiques, car elles possèdent une paroi cellulaire épaisse composée de peptidoglycane, ce qui leur permet de retenir le colorant violet de gentiane lors de la coloration de Gram (Prescott et al., 2020). En comparaison avec d'autres études, Gonzalez et al. (2008) ont observé des morphologies similaires chez les bactéries lactiques isolées du lait de brebis, indiquant une conformité avec les caractéristiques typiques de ces micro-organismes. Masoud et Jakobsen (2003) ont également décrit des formes en bacilles et coques chez leurs isolats, renforçant l'idée que ces formes sont courantes parmi les bactéries lactiques du lait de brebis. De plus, Fox et McSweeney (1998) ont noté que les bactéries lactiques à coloration Gram-positif sont dominantes dans les produits laitiers, ce qui corrobore nos observations.

Dans notre étude, tous les isolats lactiques sont des catalase -. Cette caractéristique est typique des bactéries lactiques, telles que les *Lactobacillus* et les *Streptococcus*, qui ne produisent pas l'enzyme catalase. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, et son absence chez ces bactéries est un trait distinctif utile pour leur identification (Madigan et al., 2012; Todar, 2020).

Les caractérisations physiologiques et biochimiques des isolats mettent en évidence leur diversité métabolique, ce qui les rend potentiellement précieuses dans diverses applications industrielles. Certaines souches ont montré une capacité de croissance à des températures extrêmes, ce qui suggère une adaptation à des environnements variables (Leroy & De Vuyst, 2004). Par exemple, les souches S1, S3, S9 et S10 ont bien poussé à la fois à 10°C et à 45°C, ce qui pourrait être avantageux dans des conditions industrielles où les températures fluctuent.

La tolérance au sel observée chez plusieurs souches, en particulier S3, S7, S9, S10, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19 et S20, suggère une adaptation à des environnements salins, ce qui pourrait être bénéfique dans l'industrie alimentaire (Leroy & De Vuyst, 2004). La fermentation des sucres est également un trait important, et bien que toutes les souches aient fermenté le glucose, indiquant une capacité à utiliser ce sucre comme

source de carbone, la fermentation du galactose et du saccharose était moins fréquente parmi les souches testées. Ces différences métaboliques peuvent être importantes dans le contexte des applications industrielles où ces sucres peuvent être des substrats clés.

En comparaison avec d'autres études, Gonzalez et al. (2008) ont observé des isolats de bactéries lactiques du lait de brebis qui montrent des caractéristiques similaires en termes de tolérance au sel et de capacités fermentaires, ce qui confirme les résultats de notre étude. De plus, Masoud et Jakobsen (2003) ont noté que les isolats de bactéries lactiques du lait de brebis présentent une grande diversité métabolique, ce qui est en ligne avec nos observations. Fox et McSweeney (1998) ont également mis en évidence l'importance de la tolérance au sel et des capacités fermentaires des bactéries lactiques dans l'industrie laitière, soulignant ainsi le potentiel industriel des souches étudiées.

Plusieurs études ont utilisé le SDS-PAGE pour étudier l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Giraffa, Neviani, & Carminati (1994) ont examiné les produits de dégradation protéique générés par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* dans le lait, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de leurs besoins en acides aminés. Savijoki, Ingmer, & Varmanen (2006) ont exploré les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques, mettant en lumière leur diversité et leur rôle dans la dégradation des protéines. Liu, Holland, & Crow (2003) ont examiné l'activité protéolytique des bactéries lactiques et son impact sur la formation d'esters dans les produits laitiers fermentés, mentionnant le SDS-PAGE comme un outil utilisé pour étudier les protéines impliquées dans ces processus. Exterkate & de Veer (1987) ont caractérisé une protéinase extracellulaire produite par *Streptococcus cremoris* en utilisant le SDS-PAGE, contribuant ainsi à la compréhension des mécanismes de dégradation des protéines par les bactéries lactiques. Enfin, Christensen, Dudley, Pederson, & Steele (1999) ont examiné les peptidases et le catabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques, utilisant le SDS-PAGE pour analyser les protéines et les produits de dégradation, fournissant des informations sur les voies métaboliques des bactéries lactiques.

La caséine, représentant environ 80 % des protéines du lait, est essentielle pour la formation du caillé lors de la fabrication du fromage. La  $\beta$  caséine, par exemple, est connue pour sa capacité à stabiliser les micelles de caséine, contribuant ainsi à la texture et à la fonctionnalité des produits laitiers (Fox & McSweeney, 2006).

D'autre part, les protéines sériques, principalement  $\beta$  lactoglobuline et  $\alpha$  lactalbumine, représentent environ 20 % des protéines du lait et jouent un rôle crucial dans la nutrition humaine, offrant des acides aminés essentiels et des peptides bioactifs. La  $\beta$  lactoglobuline est particulièrement importante en raison de sa capacité à lier les vitamines liposolubles et les acides gras, tandis que l' $\alpha$  lactalbumine est impliquée dans la synthèse du lactose (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006).

Ces différentes fractions protéiques sont cruciales non seulement pour la qualité nutritionnelle du lait mais aussi pour ses propriétés fonctionnelles, influençant la texture, la stabilité et la digestibilité des produits laitiers transformés (Farrell et al., 2004).

Les résultats obtenus montrent une diversité d'activités protéolytiques parmi les isolats de bactéries lactiques, ce qui est cohérent avec des études antérieures sur le lait de brebis. Par exemple, des recherches ont montré que les bactéries lactiques isolées du lait de brebis peuvent varier considérablement dans leur capacité à hydrolyser les protéines du lait (Fox et McSweeney, 1998). Ces variations peuvent être attribuées aux différences génétiques entre les souches, ainsi qu'aux conditions de croissance et de fermentation.

En particulier, des études ont rapporté que certaines souches de *Lactobacillus* et de *Streptococcus thermophilus* isolées du lait de brebis présentent des activités protéolytiques élevées, favorisant la production de peptides bioactifs bénéfiques pour la santé humaine (Leroy & De Vuyst, 2004). La capacité de certaines souches à dégrader efficacement les protéines du lait est essentielle pour des applications dans la production de fromage et d'autres produits laitiers fermentés, où la protéolyse joue un rôle crucial dans le développement de la texture et des saveurs (McSweeney, 2004).

Nos résultats de cette étude enrichissent la compréhension des capacités protéolytiques des isolats de bactéries lactiques du lait de brebis et mettent en évidence leur potentiel pour diverses applications industrielles. Les isolats avec une forte activité protéolytique, comme S13, S17, S19 et S21, pourraient être particulièrement précieux pour la production de produits laitiers fermentés avec des profils de saveur et de texture améliorés.

# **Conclusion**

## Conclusion

Cette étude a été consacrée à la méthodologie utilisée pour isoler et caractériser isolats bactériennes lactiques à partir du lait de brebis.

Les objectifs principaux étaient d'isoler ces souches, de les caractériser morphologiquement, physiologiquement et biochimiquement.

L'utilisation de techniques standardisées telles que la coloration de Gram, les tests de croissance à différentes températures et en présence de NaCl, ainsi que la fermentation des sucres, a permis une caractérisation approfondie des isolats.

Nos résultats nous a permis d'avoir une idée sur l'activité protéolytique des bactéries lactiques isolées du lait de brebis . A travers cette étude, 21 isolats des bactéries lactiques ont été purifiées et testées pour leur pouvoir protéolytique, cette activité a été confirmée par SDS - PAGE des protéines de lait où les résultats ont montré une dégradation polyvalente de 11 isolats de différentes fractions protéiques du lait.

C'est une diversité remarquable qui est peut être très utile pour toute programme d'amélioration de la qualité technologique des produits laitiers..

Nos résultats assez intéressants ouvrent les perspectives :

- De fabriquer un lait fermenté ou un fromage à l'aide des souches lactiques
- Il serait bénéfique d'approfondir l'étude des capacités enzymatiques des souches isolées, notamment en explorant d'autres méthodes de détection des activités enzymatiques.
- De plus, l'application potentielle de ces souches dans des environnements industriels ou alimentaires pourrait être explorée, en mettant l'accent sur leur tolérance aux conditions environnementales variables et leur capacité à produire des composés bioactifs bénéfiques.
- Enfin, une étude comparative avec d'autres souches lactiques ou l'optimisation des conditions de culture pourrait également enrichir notre compréhension et nos applications pratiques de ces micro-organismes.

# **Références Bibliographie**

## Références bibliographiques

- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2005). *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from fish*. *Food Control*, 16(7), 579-585.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed., pp. 1-66). New York, NY: Marcel Dekker.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 1-66). Springer.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed., pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.
- Balthazar, C. F., et al. (2017). Sheepmilk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 247-262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12254>
- Baron, S., Hadley, C., & Miller, D. (2021). *Manual of Clinical Microbiology* (12th ed.). Washington, D.C.: ASM Press.
- Beal, C., Fonseca, F., & Corrieu, G. (2008). *Impact of inoculum level and mixing conditions on oxygen uptake and growth of Streptococcus thermophilus in a non-fat, solid, skim-milk medium*. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 254-260.
- Benkrizi, M. (2019). *Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques: Enzymes et métabolites secondaires*. *Revue des Sciences Alimentaires*, 23(2), 145-162.
- Bourgeois, C. M., Larpent, J. P., & Messean, A. (1980). *Microbiologie alimentaire*. Paris: Technique et Documentation.
- Bousselmi, L., & Othmane, M. B. (2015). Composition and nutritional value of sheepmilk: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 497-512. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12228>
- Bouton, Y., Grappin, R., & Manai, G. (1993). *Assessment of the overall proteolytic activity of thermophilic lactic acid bacteria in an original experimental cheese*. *Le Lait*, 73(3), 327-342.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2023). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (28th ed.). New York, NY: McGraw Hill.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 217-246.
- Corrieu, G., & Luquet, F. M. (2008). *Fermentation et technologie laitière*. In *Bactéries lactiques* (pp. 243-268). Tec & Doc Lavoisier.
- Dalmış, Ü., & Soyer, A. (2008). *Effect of processing conditions on the quality of fermented Turkish sausages (sucuks)*. *Meat Science*, 80(2), 345-354.
- De Roissart, H., & Luquet, F. M. (1994). *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. Loriga.
- Demazeaud, M. (1996). *Microbiologie et technologie du lait: transformation du lait*. Lavoisier.
- Desmazeaud, M., Hermier, J., & Mocquot, G. (1976). *Study of the proteolytic activity of lactic acid bacteria in a synthetic medium: III. Evidence of a prolyl-dipeptidase in certain strains of lactic acid bacteria*. *Le Lait*, 56(551-552), 502-516.
- Dortu, C., & Thonart, P. (2008). *Les bactéries lactiques: Utilisations industrielles et propriétés antibactériennes*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(1), 93-102.
- Driessen, F. M. (1988). *Fermented milks: properties and improvement*. *International Journal of Dairy Technology*, 41(3), 56-61.
- Drosinos, E. H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., & Metaxopoulos, J. (2007). *Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece*. *Food Microbiology*, 24(3), 260-270.

- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2000). Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4742-4749. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4742-4749.2000>
- El-Aidy, H. A., Aly, S. A., & Ahmed, H. A. (2015). Impact of probiotics and prebiotics on colonization resistance against pathogens. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 34(1), 1-8.
- El-Aidy, S., Kaji, I., & Kronsteiner, B. (2015). Functional dynamics of gut microbiota in health and disease. *J Gastroenterol*, 50(1), 45-57.
- Exterkate, F. A. (1976). Proteinases and peptidases of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1(3), 165-169.
- Exterkate, F. A., & de Veer, G. J. (1987). Characterization of an extracellular proteinase from *Streptococcus cremoris* HP. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 799-803.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional.
- Giraffa, G., Neviani, E., & Carminati, D. (1994). Proteolytic activity and amino acid requirements of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in milk. *Journal of Dairy Research*, 61(1), 151-154.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2007). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by lactic acid bacteria: Volatile and non-volatile components. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 779-788.
- Gonzalez, A., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2008). Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 565-574.
- Gonzalez, A., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2008). Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 565-574.
- Gonzalez, M., Hernandez, P. E., & Fresno, J. M. (2008). Lactic acid bacteria isolated from sheep milk: Typing and technological characterization for cheese production. *Food Microbiology*, 25(4), 607-614.
- Guiraud, J. P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Paris: Dunod.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). *The genera Lactobacillus and Carnobacterium*. In *The Prokaryotes* (pp. 320-403). Springer.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd ed., pp. 320-403). New York: Springer.
- Hardie, J. M., & Whitley, R. A. (1997). *Classification and identification of Streptococcus and Enterococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology* (6th ed., pp. 333-346). American Society for Microbiology.
- Hardie, J. M., & Whitley, R. A. (Eds.). (1997). *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional.
- Hilali, M., et al. (2011). Composition and characteristics of Moroccan Beni Guil sheep's milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 50-56.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., McSweeney, P. L., & O'Neill, E. E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science*, 62(2), 205-216.
- Hylckama Vlieg, J. E., & Hugenholtz, J. (2007). *Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 75-79.
- Idoui, T., Karam, N. E., & Bougherara, N. (2009). Purification et caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre de la région de Béjaïa (Algérie). *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5620-5628.
- Idoui, T., Karam, N. E., & Bougherara, N. (2009). Purification et caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre de la région de Béjaïa (Algérie). *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5620-5628.

- Jones, G. M. (1978). Microbial Ecology of the Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), 136-140.
- Kamaly, H., & Marth, E. H. (1998). Implications de l'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés pour leur système protéolytique.
- Klaenhammer, T. R., Altermann, E., & Barrangou, R. (2002). The complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 2870-2883.
- Klaenhammer, T. R., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J. R., ... & De Vos, W. M. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 29-58. <https://doi.org/10.1023/A:1020638309915>
- Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2003). Lactic acid bacteria as a versatile tool for fermentation processes. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 505-509. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.09.010>
- Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 2, 1.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). *Bioactive peptides: Production and functionality*. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4th ed.). CRC Press.
- Larrouture, T., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2000). *Contribution à la connaissance de la biologie des moisissures présentes dans les saucisses sèches*. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 117(5), 19-25.
- Law, B. A., & Sharpe, M. E. (1978). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(1), 1-11.3.5
- Law, B. A., & Haandrikman, A. J. (1997). Fonctionnement du système protéolytique des bactéries lactiques en l'absence de synthèse d'acides aminés.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Leveau, J. Y., Bouix, M., & Floury, M. (1991). Techniques d'analyse en microbiologie alimentaire. In J. Lenepveu, *Microbiologie alimentaire* (pp. 245-268). Paris: Masson.
- Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2003). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). San Francisco, CA: Benjamin Cummings.
- Masoud, W., & Jakobsen, M. (2003). Molecular identification of lactic acid bacteria associated with Danish blue cheese. *International Dairy Journal*, 13(2-3), 255-264.
- Masoud, W., & Jakobsen, M. (2003). The combined effect of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 754-765.
- Masoud, W., & Jakobsen, M. (2003). The combined effect of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 754-765.

- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheeseripening: Introduction and overview. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Mduduzi P, M. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review, 2
- Novel, G. (1993). Genomic diversity and evolution within the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 237-269.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*. Gyldendalske Boghandel, Nordisk Forlag.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). *Characterization of Micrococccaceae isolated from dry fermented sausage*. *Food Microbiology*, 20(6), 627-634.
- Parente, E., & Cogan, T. M. (2004). *Starter cultures: General aspects*. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 123-139). Academic Press.
- Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H. Y. (2006). *Probiotics and their fermented food products are beneficial for health*. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Pot, B. (2008). *The genus Lactobacillus*. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* (pp. 29-353). Springer.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020). *Microbiology* (11th ed.). McGraw-Hill Education.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020). *Microbiology* (10th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Quiberoni, A., Repizo, G. D., & Reinheimer, J. A. (2001). Biodiversity of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 27-37.
- Roudj, A. (2011). Le système protéolytique des bactéries lactiques : composition et fonctionnement.
- Samelis, J., Maurogenakis, F., & Metaxopoulos, J. (1994). Recent developments in the study of traditional Greek dairy products: a review. *Food Research International*, 27(1), 59-75.
- Sandine, W. E. (1988). Ecology of lactic streptococci in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 71(1), 160-169.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Buckley, D. J., & Arendt, E. K. (2004). *Determination of the influence of a number of lactic acid bacteria on the physical and chemical properties of cooked hams*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 402-410.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (2002). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Todar, K. (2020). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Retrieved from
- Todar, K. (2020). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Retrieved from
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- Walker, J. M. (2017). *The Protein Protocols Handbook* (4th ed.). New York, NY: Springer.
- Zhen, M., Du, H., Zong, H., & Wang, W. (2021). Advances in morphological and physiological characteristics of lactic acid bacteria. *Food Research International*, 140, 109928. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109928>

# **Annexes**

## Annexe1

### ➤ Milieux de culture

#### • Milieu M 17

Pétrone de soja .....	05g
Peptone de caséine.....	2, 5g
Peptone de viande .....	2,5g
Extrait de viande.....	05g
Extrait de levure.....	2,5g
Lactose .....	05g
Acide ascorbique .....	0,5g
Glycérophosphate de sodium .....	19g
Sulfite de magnésium.....	0,25g
Agar- Agar.....	12g

pH=7.2; Autoclave 15 min 121 °C

#### • Milieu MRS (Man- Rogosa- Sharpe)

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80(polysorbate =80).....	1ml
Phosphate dipotassique .....	2g
Acétate de potassium.....	5g
Citrate triammonique .....	2g
Sulfite de magnésium .....	0,2g
Sulfite de manganèse.....	0,05g

pH= 6.8, Autoclaver 15 min à 121°C.

#### • Gélose nutritive

Peptone .....	6g
Extrait de levure .....	3g
Eau .....	1000ml
Agar- agar .....	15g

Autoclave 15min à 121°C

### ➤ Milieux liquides

#### • MRS- Bouillon

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	8g
Extrait de levure .....	4g
Glucose .....	20g
Acétate de sodium trihydraté .....	5,0 g
Citrate d'ammonium .....	2,0 g
Tween 80 .....	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium .....	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté .....	0,05 g

pH = 6.2

## ➤ Les colorants

## • Violet de gentiane au cristal

Violet de gentiane ..... 1g  
 Phénol ..... 02g  
 Ethanol à 90%..... 10ml  
 Eaudistillée..... 100ml

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble, l'eau est ajoutée ensuite.

## • Lugol (à mettre dans un Flacon brun)

Iode ..... 1g  
 IOdure de potassium ..... 2g  
 Eaudistillée.....100ml

## • Fuchsine de Ziehl

Fuchsinebasique..... 10g  
 Phénol ..... 50g  
 Ethanol à 0.5..... 10cm<sup>3</sup>  
 Eau distillée .....1 dm<sup>3</sup>

## Annexe 2

## Les tampons et solutions utilisés pour SDS-PAGE

## Préparation des gels

En mL	Gel de séparation 12% T : 12,52% C : 0,97%	Gel de concentration 2% T : 2,88% C : 1,42%
Acrylamide 40%	6,2	0,5
Bisacrylamide 2%	1,2	0,1
Eau permutée	4,3	5,1
Tampon Tris-HCL	7,6 à pH=8.8	0,8 à pH=6.8
SDS 10%	0,20	0,07
APS 10%	0,50	0,35
TEMED	0,010	0,007
Volume total	20	7

## Tampon Tris-HCL pH : 8,8 (BOA)

Calibrer le pH mère si cela n'a pas été fait récemment.

Tris (hydroxyméthylaminomethane).....60, 57g  
 Eau .....qsp 400ml  
 Ajuster à pH 8,8 avec du HCL fumant.....8 à 10 ml  
 Eau .....qsp 500ml

Conserver à 4°C.

#### **Tampon Tris- HCL pH :6,8 (BOA)**

Calibrer le pH mètre si cela n'a pas été fait récemment.

Tris (hydroxyméthylaminomethane).....30, 285g

Eau .....qsp 200mL

Ajuster à pH 6,8 avec du HCL fumant.....19,5 ml

Eau .....qsp 250ml

Conserver à 4°C.

#### **Solution stock de SDS à 10% (SORBONNE, GANTS, MASQUE pour la pesée)**

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).....1g

Eau .....qsp10 ml

Stocker à température ambiante.

#### **Solution d'ammonium peroxydisulfate à 1%(SORBONNE)**

A.P.S.(stocké au frigo).....0,2g

Eau .....qsp 20 ml

A préparer le jour même.

#### **Tampon d'électrophorèse**

Le tampon des cuves doit être renouvelé lorsque le voltage dépasse 500V en fin de migration (environ 20 utilisations), prévoir 4 litres par cuve.

Prévoir 1 litre pour le bac supérieur à chaque électrophorèse

Glycine .....70,55g

Tris .....15g

SDS.....5g (SORBONNE,GANTS,MASQUE pour la pesée

Eau.....qsp5 litres .

Stocker à température ambiante.

#### **Solution mere de bleu de Coomassie R2**

Blue de Coomassie R250.....10

Ethanol 95.....qsp1000 ml

Laisser en agitation au moins 2 heures . Filtrer cette solution avec un filtre plissé n ° 3 Attention mettre en 1 " l'alcool dans le bêcher avec I barreau aimanté en agitation , puis mettre le bleu de Coomassie dans le bêcher en agitation ( sinon le bleu prend en masse au fond du contenant )

• Acide Trichloracétique 60% (GANTS)

• TCA .....1kg

• Eau Ulte pure .....qsp 1667ml

## Résumé

Notre projet de recherche vise à mettre en évidence l'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait de brebis sur milieu MRS. Dans la première partie, l'identification des bactéries lactiques a été réalisée à l'aide de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'activité protéolytique a été recherchée par SDS-PAGE, révélant que 11 souches sur 21 présentaient une variabilité remarquable et une richesse enzymatique pour la dégradation des fractions protéiques. L'analyse des profils électrophorétiques a permis d'évaluer le polymorphisme de ces souches. Certains isolats ont montré une forte activité protéolytique, tandis que d'autres présentaient des activités faibles à modérées. La technique SDS-PAGE s'est avérée efficace dans ce contexte.

Mots clés : Lait de brebis, Bactérie lactique, activité protéolytique, SDS-PAGE.

## ملخص

يهدف مشروعنا البحثي إلى تسليط الضوء على النشاط البروتيني للسلاسل البكتيرية الحمضية اللبنية المعزولة من حليب الأغنام على وسط MRS في الجزء الأول، تم تحديد البكتيريا الحمضية اللبنية باستخدام الاختبارات الشكلية والفسولوجية والكيميائية الحيوية. تم البحث عن النشاط البروتيني باستخدام تقنية SDS-PAGE ، كاشفاً أن 11 سلالة من أصل 21 أظهرت تنوعاً ملحوظاً و غنى إنزيمياً لتحليل الكسور البروتينية. سمح تحليل النماذج الكهربائية بتقييم تعددية الأشكال لهذه السلالات. أظهرت بعض العزلات نشاطاً بروتينياً قوياً، بينما أظهرت عزلات أخرى نشاطات ضعيفة إلى متوسطة. أثبتت تقنية SDS-PAGE فعاليتها في هذا السياق.

**الكلمات المفتاحية:** حليب الأغنام، بكتيريا حمضية لبنية، نشاط بروتيني، SDS-PAGE.

## Summary

Our research project aims to highlight the proteolytic activity of lactic acid bacteria strains isolated from sheep's milk on MRS medium. In the first part, the identification of lactic acid bacteria was carried out using morphological, physiological, and biochemical tests. The proteolytic activity was investigated using SDS-PAGE, revealing that 11 out of 21 strains showed remarkable variability and enzymatic richness for the degradation of protein fractions. The analysis of electrophoretic profiles allowed us to evaluate the polymorphism of these strains. Some isolates exhibited strong proteolytic activity, while others showed low to moderate activities. The SDS-PAGE technique proved effective in this context.

**Keywords:** Sheep's milk, Lactic acid bacteria, Proteolytic activity, SDS-PAGE.