



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

Mise en évidence de la dégradation de quelques acides aminés par des bactéries lactiques isolées à partir du yaourt, du lben (lait fermenté) et du fromage

---

Présenté par : Anana Dounya  
Boursas Sourour

Le : 24 /06/2024

Jury d'évaluation :

Président : Bouzraib.L (MAA – UFM Constantine 1).

Encadrant : Zermane.F (MAA - UFM Constantine 1).

Examinateur(s) : Mergoud.L (MAA - UFM Constantine 1).

Année universitaire  
2024 – 2025

## *Remerciements*

Nous remercions en premier lieu DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le Tout-Puissant. Louange à ALLAH, Seigneur des mondes, qui nous a permis de réaliser ce travail, ainsi que pour Ses innombrables bienfaits.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrante, Mme **Zermane.F.**, maître-assistante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des Frères Mentouri –Constantine1, pour ses encouragements, ses conseils avisés, sa disponibilité, et surtout pour sa patience lors de la correction de ce mémoire.

Nous tenons à remercier sincèrement Mme **Bouzraib.L** , maître-assistante à l'Université des Frères Mentouri Constantine1, d'avoir accepté de présider notre jury.

Nous exprimons également notre reconnaissance à Mme **Mergoud.L** maître-assistante à la même université, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent à tous les enseignants du département des sciences biologiques de l'Université des Frères Mentouri Constantine1.

Nous remercions chaleureusement les techniciennes des laboratoires pédagogiques des départements de microbiologie et de biochimie, ainsi que Messieurs Houcine et Brahim (responsables des laboratoires), et Monsieur Amar (responsable du magasin), pour leur aide précieuse et leur bonne humeur tout au long de notre travail.

## **Dédicace**

*Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH qui m'a aidé et Donné le courage et la patience pour effectuer ce travail*

### **À mon père, MOURAD ;**

*Mon bras droit, mon repère, et parfois même ce frère protecteur que la vie m'a offert. Merci pour ta force, ta sagesse et ta présence indéfectible dans les moments les plus décisifs de mon parcours. Et ton amour inconditionnel, tes sacrifices discrets, et ta foi en moi, même quand je doutais.*

*C'est grâce à ton courage et ta persévérance que j'ai pu aller aussi loin.*

### **À ma mère, SEMRA KARIMA ;**

*Plus qu'une mère, une sœur, une confidente et une amie précieuse. La femme de ma vie, mon refuge, ma source d'inspiration.*

*Merci pour ton amour infini, ton soutien sans faille et tes prières qui m'ont porté jusqu'ici. Ce mémoire est le fruit de ton dévouement et de ta force.*

*Je te le dédie avec tout mon cœur.*

### **À mes chères tantes ;**

*Merci pour votre affection sincère, vos mots réconfortants et votre présence à chaque étape importante de ma vie.*

*Votre tendresse et vos encouragements m'ont toujours donné la force d'avancer.*

*En particulaires zakia, khandouda Vous avez été pour moi bien plus que des tantes : de véritables deuxièmes mères, toujours présentes, toujours attentionnées. Celles qui m'ont élevée avec tant d'amour, de générosité et de patience. Je vous dois une part de ce que je suis aujourd'hui.*

*Ce mémoire vous est dédié, avec tout mon amour et ma reconnaissance*

### **À mes cousines, du côté paternel comme maternel ;**

*Celles avec qui j'ai grandi, partagé des rires, des secrets, et tant de souvenirs, chacune a laissé une trace particulière dans mon cœur.*

*Merci pour votre affection, votre énergie, et votre présence à chaque étape. Ce mémoire est aussi pour vous.*

### **À ma chère cousine Zeineb, et ses enfants**

*Bien plus qu'une cousine, tu es pour moi une sœur de cœur.*

*Ta présence, ton attention constante et de me demander sans cesse : "Win 3odti f mémoire ?", de t'inquiéter pour moi, de m'encourager avec ton cœur grand ouvert. Merci pour ton affection sincère, ton soutien discret mais précieux, et ta tendresse fraternelle.*

*À Rania et Younes, deux petits soleils qui illuminent les cœurs autour d'eux.*

*Je vous dédie ce travail avec beaucoup d'amour et de tendresse...*

### **À ma binôme, ma précieuse amie Dounia,**

*Celle avec qui j'ai tout partagé : la fatigue, les fous rires, les doutes... et surtout cette belle complicité.*

*On s'est levées tôt, on est parties ensemble, revenues épuisées, après des journées de pratique de 8h à 17h — sans pause, sans plainte... mais avec beaucoup de courage.*

*Merci pour ta patience, ta douceur, ta force et ton soutien sans faille.*

*Tu as été bien plus qu'un binôme : une sœur de cœur, une vraie amie.*

*Ce mémoire, je te le dédie avec tendresse et reconnaissance. On l'a vécu ensemble, il est aussi à toi.*

***À mes chères copines, tous les filles de spécialité BMM promo 2025 précisément mes amours Nourhan, Badra, Nibal, Anwar***

*Celles qui ont partagé mes joies, mes doutes, mes longues heures de travail et mes fous rires.*

*Merci pour votre présence, votre écoute, vos encouragements et votre amitié fidèle tout au long de ce parcours.*

*Votre soutien a été précieux, et ce mémoire vous est dédié avec toute mon affection.*

***À mon ami Anis,***

*Merci pour ta présence, ton soutien et tes encouragements tout au long de ce parcours. Ton amitié m'a été précieuse dans les moments de doute comme dans ceux de réussite. Ce mémoire t'est dédié avec toute ma reconnaissance et mon estime.*

***Boursas Sourour***

## Dédicace

*Avant tout, je rends grâce à Allah, Le Tout-Puissant, pour Son infinie miséricorde, pour la force, la patience et le courage qu'Il m'a accordés tout au long de ce parcours. Sans Lui, rien de tout cela n'aurait été possible.*

*J'exprime toute ma gratitude à ma chère maman **Khacha NADIA**, la femme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et la source de ma joie et de mon bonheur. Elle est la flamme de mon cœur, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir. Que Dieu la protège et la garde précieusement pour moi.*

*À mon père **Aissa Anana**, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur, je souhaite une santé durable et une longue vie. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le profond respect que je lui porte.*

*À mes sœurs bien-aimées,*

***Rahma**, ma tendre sœur, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton soutien inconditionnel et ta présence à chaque étape.*

***Imen**, ma sœur de cœur, mon reflet, je te souhaite de tout cœur la réussite au baccalauréat — que ta joie soit la prochaine à éclater.*

***Roukaya**, mon petit ange, si précieuse à mes yeux, que Dieu veille sur toi et t'accompagne dans chaque pas.*

*Et toi, **Mohamed El Amine**, mon frère, mon héros, mon bras droit — reste fort, courageux, et lumineux comme tu l'as toujours été. Que Dieu vous garde tous pour moi.*

*Je remercie du fond du cœur **mon ami Yasser** pour sa présence constante, son soutien inestimable et ses mots encourageants qui m'ont portée dans les moments difficiles. Tu as toujours cru en moi, et je ne l'oublierai jamais. .*

*Un grand merci à ma binôme **Sourour**, avec qui j'ai traversé les difficultés main dans la main, surmontant ensemble les épreuves et menant ce mémoire à son terme. Merci infiniment, que Dieu te bénisse.*

*Je suis également reconnaissante à ma tante adorée **Abla Anana**, toujours présente avec ses prières, son amour et ses encouragements inconditionnels.*

*Mes remerciements vont aussi à tous mes camarades de la promotion **BMM**, particulièrement mes amies **Anouar, Badra, Nerhane, Nibal et Aya**. — que Dieu vous protège.*

*Je remercie aussi du fond du cœur **ma chère amie Asma de Mostaganem**, pour son courage, sa gentillesse et le soutien moral qu'elle m'a toujours offert.*

*Enfin, je remercie du fond du cœur chaque personne qui m'a soutenue, de près ou de loin — ma famille, mes oncles, mes tantes, leurs enfants, ainsi que mes proches et mes amis — par un geste, une parole, une prière ou une pensée. Merci infiniment.*

*Anana Dounya*

# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>ملخص.....</b>	<b>xvi</b>
<i>Introduction .....</i>	<i>1</i>
<i>Synthèse Bibliographique</i>	
<b>Chapitre 1: les bactéries lactiques</b>	
1. Définition.....	3
2. Origine et habitat.....	3
3. Caractère des bactéries lactiques .....	4
3.1. Caractères morphologiques .....	4
3.2. Caractères physiologiques et biochimiques.....	5
4. Classification des bactéries lactique.....	6
4.1. Classification morphologique et physiologique des bactéries lactique .....	6
4.2. Classification phylogénétique .....	7
5. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques .....	8
5.1. Exigences en acides aminés.....	8
5.2. Exigences en vitamines .....	8
6. Intérêt des bactéries lactiques.....	9
7. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques.....	10
7.1. Activité acidifiante.....	10
7.2. Propriétés enzymatiques .....	10

7.3. Propriétés probiotiques des bactéries lactiques .....	11
<b>Chapitre 2: les acides aminés</b>	
1. Définition et structure générale des acides aminés .....	13
2. Classification des acides aminés .....	14
2.1. Classifications selon la chaîne .....	14
2.2 Classification selon le besoin nutritionnel .....	14
3. Métabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques.....	14
3.1. Besoin en acides aminées .....	14
3.2. Voies générales de dégradation des acides aminés .....	15
3.3. Voies spécifiques de dégradation chez les bactéries lactiques .....	15
3.4. Réactions couplées et environnement.....	16
4. Mécanismes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des acides aminés par les bactéries lactiques .....	17
4.1. Transamination .....	17
4.2. Désamination oxydative .....	17
4.3. Décarboxylation des acides aminés .....	18
4.4. Chemins spécifiques de catabolisme des acides aminés .....	18
4.5. Enzymes de racémisation .....	18
5. Facteurs influençant la dégradation des acides aminés par les bactéries lactiques....	19
5.1. pH et stress acide .....	19
5.2. Composition et disponibilité des nutriments .....	19
5.3. Température .....	20
5.4. Autolyse bactérienne .....	20
5.5. Phase de croissance et conditions de fermentation .....	20
5.6. Stress environnementaux .....	21
7. Impacts de la dégradation des acides aminés.....	22
8. Pouvoir et activité protéolytique des bactéries lactiques.....	22
9. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.....	24
10.Comparaison entre la dégradation des acides aminés .....	24

<i>Materiel et méthodes</i> .....	27
1...Lieu de travail.....	26
2. Matériel.....	26
2.1 Matériel biologique.....	26
2.2 Matériel de laboratoire .....	26
3. Méthodes.....	27
3.1. Traitement des échantillons .....	27
3.2. Isolement et purification des bactéries lactiques .....	28
3.3. Identification des bactéries lactiques .....	29
3.4. Etude physiologique .....	31
3.4.1 Test de croissance à différentes températures .....	31
3.4.2 Test de croissance à différents pH .....	31
3.4.3. Croissance sur milieu hyper salé .....	32
3.4.3. Test de thermorésistante .....	32
3.5. Tests biochimiques.....	33
3.5.1. Recherche de la catalase .....	33
3.5.2. Recherche de l'oxydase.....	34
3.6. Test de la fermentation des sucres.....	37
3.6.1. Utilisation du Mannitol .....	37
3.6.2. Utilisation des sucres : Glucose, lactose, saccharose.....	38
3.7. Tests de dégradation des acides aminés.....	39
3.7.1. Test de production d'acétoïne .....	39
3.7.2. Test de mise en évidence de l'arginine dihydrolase (ADH) .....	40
3.7.3. Test de mise en évidence de lysine décarboxylase (LDC) .....	41
3.7.4. Test de mise en évidence de phénylalanine désaminase .....	42
3.7.5 Test de mise en évidence de tryptophanase .....	43
3.8. Technique de conservation .....	43
3.8.1 Conservation à courte durée .....	43
3.8.2 Conservation sur une longue durée .....	43
3.9. Suivi de la cinétique de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées .....	44

<i>Résultats et discussion</i> .....	46
<b>1. Résultats.....</b>	<b>46</b>
<b>1.1. Isolement des bactéries lactiques.....</b>	<b>46</b>
<b>1.2. Identification des bactéries lactiques.....</b>	<b>46</b>
<b>1.2.1. Caractères morphologiques.....</b>	<b>46</b>
<b>1.2.2. Caractères physiologiques.....</b>	<b>50</b>
<b>1.2.3. Caractères biochimiques .....</b>	<b>54</b>
➤.. <b>Test de la fermentation des sucres .....</b>	<b>56</b>
➤.. <b>Test d'utilisation de quelques acides aminés.....</b>	<b>58</b>
<b>1.3. Suivi de la cinétique de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées .....</b>	<b>60</b>
<b>2. Discussion.....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. Identification des bactéries lactiques.....</b>	<b>65</b>
<b>2.2. Test de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées Conclusion .....</b>	<b>69</b>
<b>2.2.1. Test de dégradation de la phenylalanine.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.2. Test de dégradation de la tyrosine.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.3. Test de dégradation de la cystéine.....</b>	<b>69</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>70</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>81</b>

## ***Liste des Figures***

<b>Figure 1:</b> la forme cocci des bactéries lactiques observe au microscope electronique a transmission 100X (Makhloufi, 2011).....	5
<b>Figure 2:</b> la forme bacille des bactéries lactiques observé au Microscope électronique à transmission (Makhloufi, 2011).....	1
<b>Figure 3:</b> Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Hammi, 2016).....	1
<b>Figure 4:</b> Les dilutions décimales .....	1
<b>Figure 5:</b> Diagramme d'isolement des souches lactiques .....	1
<b>Figure 6 :</b> test de catalase .....	1
<b>Figure 7 :</b> Réaction de l'oxydase .....	1
<b>Figure 8 :</b> Réaction du Mannitol .....	1
<b>Figure 9:</b> Réaction des sucres : Glucose, lactose, saccharose .....	1
<b>Figure 10 :</b> Réaction d'acétoïne .....	1
<b>Figure 11 :</b> Réaction de l'arginine dihydrolase (ADH) .....	1
<b>Figure 12:</b> Réaction de l'ornithine décarboxylase (ODC) .....	1
<b>Figure 13:</b> Réaction de lysine décarboxylase (LDC) .....	1
<b>Figure 14:</b> Réaction de phénylalanine désaminase .....	1
<b>Figure 15:</b> Réaction de tryptophanase .....	1
<b>Figure 16:</b> Test de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées. ....	1
<b>Figure 17:</b> test de thermorésistante .....	1
<b>Figure 18:</b> résultats de de la galerie API 20 E de 4 souches bactériennes lactiques .....	1
<b>Figure 19:</b> résultat de test phénylalanine désaminase de quatre souches après l'ajout de réactif.....	1
<b>Figure 20:</b> Dégradation de la phénylalanine par des bactéries lactiques sur un milieu M17 .....	1
<b>Figure 21:</b> Dégradation de la phénylalanine par les bactéries lactiques sur le milieu minimum.....	1
<b>Figure 22:</b> Dégradation de la cystine par les bactéries lactiques.....	1
<b>Figure 23:</b> Dégradation de la tyrosine par les bactéries lactiques en consortium.....	1

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques distinctives des différents genres de bactéries lactiques (Axelsson, 2004).....	1
<b>Tableau 2:</b> Tableau synthétique du métabolisme des acides aminés .....	1
<b>Tableau 3 :</b> Enzymes clés et fonctions associées dans le métabolisme des acides aminés .....	1
<b>Tableau 4:</b> Comparaison entre la dégradation des acides aminées normal et par bactérie .....	1
<b>Tableau 5 :</b> matériel de laboratoire qui utilisé dans notre travail (appareillage, milieux de culture, verreries et autres).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau 6:</b> Tableau de lecture de la galerie Api 20 E .....	1
<b>Tableau 7:</b> Caractères morphologiques des bactéries lactique isolées .....	1
<b>Tableau 8:</b> des caractères microscopique .....	1
<b>Tableau 9:</b> Croissance des bactéries lactiques isolées à différentes températures .....	1
<b>Tableau 10:</b> Croissance des bactéries lactiques isolées à différents PH .....	1
<b>Tableau 11:</b> Croissance des bactéries lactiques isolées sur milieu hyper salé .....	1
<b>Tableau 12:</b> Caractères biochimiques des bactéries lactiques isolées .....	1
<b>Tableau 13:</b> Résultats de fermentation des sucres .....	1
<b>Tableau 14:</b> Test d'utilisation de quelques acides aminés .....	1

## Liste des abréviations

**AA** : Acides aminés

**AlaR** : Alanine racemase (Racémase de l'alanine)

**Acétyl-CoA** : Acétyl coenzyme A, intermédiaire du métabolisme

**ADI** : Arginine Deiminase Pathway (Voie arginine-déiminase)

**ALAT** : Alanine aminotransférase

**ArcA** : Arginine deiminase (enzyme clé de la voie ADI)

**ASAT** : Aspartate aminotransférase

**Asp** : Acide aspartique

**AspR** : Aspartate racemase (Racémase de l'aspartate)

**BCAA** : Branched-Chain Amino Acids (acides aminés à chaîne ramifiée – leucine, isoleucine, valine)

**BL** : Bactéries lactiques

**CEP** : Cell Envelope Proteinase (Protéinase de l'enveloppe cellulaire)

**D** : Dextrogyre (forme dextro de l'acide lactique)

**DL** : Dextro-Lévogyre (forme racémique de l'acide lactique)

**DtpP** : Dipeptide transporter P (Transporteur de dipeptides)

**DtpT** : Dipeptide/tripeptide transporter T (Transporteur de di- et tripeptides)

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**G+C** : Teneur en guanine + cytosine

**GEL** : Gélatinase

**GLC** : Glucides

**GLU** : Glucose

**Glu** : Acide glutamique

**GluR** : Glutamate racemase (Racémase du glutamate)

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**IND** : Indole

**L** : Lévogyre

**Lys** : Lysine (acide amine)

**Opp** : Oligopeptide permease

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**Oxaloacétate** : Intermédiaire du cycle de Krebs

**PLP** : Phosphate de pyridoxal (coenzyme pour transaminases et décarboxylases)

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de certaines bactéries lactiques (BL), isolées à partir de produits laitiers fermentés (yaourt, lben et fromage), à dégrader enzymatiquement trois acides aminés : la phénylalanine, la tyrosine et la cystéine. Cette démarche vise à identifier des souches présentant un potentiel d'application dans la bioconversion de ces composés, dans le but d'améliorer les propriétés sensorielles des produits fermentés et de contribuer à la gestion de certains troubles métaboliques. Quatre souches de BL (S1, S4, S5 et S12) ont été isolées, identifiées et caractérisées sur les plans morphologique, physiologique et biochimique. Des tests enzymatiques ont permis d'évaluer leur aptitude à métaboliser les acides aminés ciblés. Les résultats ont montré que S1 appartient au genre *Lactococcus*, S4 à *Pediococcus*, S5 à *Enterococcus*, et S12 à *Enterococcus faecium*. L'analyse des profils enzymatiques a révélé une activité marquée de la souche S5 sur la phénylalanine, une capacité spécifique de S4 à métaboliser la tyrosine, une activité modérée de S1 sur la cystéine, et une double activité de S12, élevée sur la phénylalanine et plus faible sur la cystéine. Ces résultats soulignent le potentiel technologique et probiotique de ces souches, et leur intérêt pour des applications en bioconversion et en nutrition fonctionnelle.

**Mots-clés** : bactéries lactiques, acides aminés, bioconversion, troubles métaboliques.

## Abstract

The objective of this work is to evaluate the enzymatic degradation capacity of certain lactic bacteria (LB), isolated from fermented dairy products (yogurt, lben, and cheese), toward three amino acids: phenylalanine, tyrosine, and cysteine. The aim is to identify strains with potential applications in the bioconversion of these compounds, in order to enhance the sensory qualities of fermented products and contribute to the management of certain metabolic disorders. Four LB strains (S1, S4, S5, and S12) were isolated, identified, and characterized based on morphological, physiological, and biochemical criteria. Enzymatic tests were conducted to assess their ability to metabolize the targeted amino acids. Results showed that strain S1 belongs to the genus *Lactococcus*, S4 to *Pediococcus*, S5 to *Enterococcus*, and S12 specifically to *Enterococcus faecium*. Metabolic profiling revealed that S5 exhibited significant activity on phenylalanine, S4 showed a specific ability to metabolize tyrosine, S1 demonstrated moderate activity on cysteine, and S12 stood out with dual activity: high on phenylalanine and lower on cysteine. These findings highlight the technological and probiotic potential of certain strains, suggesting their relevance for applications in amino acid bioconversion and functional nutrition.

**Keywords:** lactic bacteria, amino acids, bioconversion, metabolic disorders.

## ملخص

هدف هذا العمل هو تقييم قدرة بعض سلالات البكتيريا اللبنية، المعزولة من منتجات الألبان المخمرة (اللبن، الياغورت والجبن)، على التحلل الإنزيمي لثلاثة أحماض أمينية: الفينيل ألانين، التيروزين، والسيستين. يهدف هذا البحث إلى تحديد سلالات تمتلك إمكانيات تطبيقية في التحويل الحيوى لهذه المركبات، بهدف تحسين الخصائص الحسية للمنتجات المخمرة والمساهمة في إدارة بعض الاضطرابات الأيضية. تم عزل أربع سلالات من البكتيريا اللبنية : S1، S4، S5 وS12، وتحديد إمكاناتها وتصنيفها بناءً على خصائصها الشكلية، الفسيولوجية، والكيميائية الحيوية. أجريت اختبارات إنزيمية لتقييم قدرتها على استقلاب الأحماض الأمينية المستهدفة. أظهرت النتائج أن السلالة S1 تنتهي إلى جنس *Lactococcus*، و S4 إلى *Pediococcus*، و S5 إلى *Enterococcus faecium*، بينما تنتهي S12 تحديداً إلى *Enterococcus*. كشفت الدراسة أن السلالة S5 أظهرت نشاطاً مرتفعاً تجاه الفينيل ألانين، بينما أظهرت S4 قدرة خاصة على استقلاب التيروزين، وسجلت S1 نشاطاً متوسطاً تجاه السيستين، في حين تميزت S12 بنشاط مزدوج: مرتفع على الفينيل ألانين وأقل على السيستين. تبرز هذه النتائج إمكانيات التكنولوجية والبروبتيكية لبعض السلالات، مما يشير إلى أهميتها في تطبيقات التحويل الحيوى للأحماض الأمينية والتغذية الوظيفية.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا لبنية ، الأحماض الأمينية، التحويل الحيوى، الاضطرابات الأيضية.

# Introduction

### Introduction

Aujourd’hui, un grand nombre de personnes, en Algérie comme ailleurs, sont affectées par des troubles métaboliques liés à un déficit enzymatique empêchant la dégradation de certains acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane. Cette incapacité métabolique entraîne une accumulation anormale de ces composés dans le sang, représentant un risque majeur pour la santé (**Blau et al., 2010**). En l’absence de traitements curatifs efficaces, la prise en charge repose principalement sur un régime alimentaire strict et appauvri en acides aminés, qui demeure actuellement la seule option thérapeutique viable (**van Wegberg et al., 2017**).

C’est dans cette perspective que s’inscrit notre recherche, qui vise à explorer une alternative biologique naturelle en s’intéressant aux bactéries lactiques (BL). Présentes abondamment dans l’environnement et utilisées depuis des millénaires dans la fermentation des aliments, ces microorganismes sont reconnus pour leur sécurité d’utilisation et leur rôle bénéfique sur le microbiote intestinal (**Hill et al., 2014**). Certaines souches pourraient produire des enzymes capables de dégrader spécifiquement certains acides aminés problématiques, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles approches en nutrition et en santé (**Gänzle, 2015**).

Les acides aminés jouent un rôle fondamental dans le métabolisme cellulaire, non seulement en tant que constituants des protéines, mais également comme précurseurs de nombreuses molécules bioactives (**Li et al., 2021**). Dans les aliments fermentés, et en particulier les produits laitiers, les bactéries lactiques sont connues pour leur activité enzymatique leur permettant de métaboliser différents acides aminés (**Sarantinopoulos et al., 2002 ; Gänzle, 2015**). Ces transformations peuvent d’ailleurs influencer les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des aliments (**Liu et al., 2014**).

Les BL utilisent notamment des enzymes telles que les aminotransférases, décarboxylases et déshydrogénases pour convertir les acides aminés en composés bioactifs tels que les amines biogènes, les acides organiques ou des dérivés aromatiques (**Yvon et Rijnen, 2001 ; Fernández et Zúñiga, 2006**). Ces métabolites peuvent exercer une influence

importante sur l'axe alimentation-hôte, notamment au niveau du système digestif (**Rooks et Garrett, 2016**).

Malgré les avancées réalisées dans la compréhension des mécanismes enzymatiques chez les bactéries lactiques, une lacune importante demeure : peu d'études intègrent une approche à la fois fonctionnelle et probiotique pour valoriser leur potentiel dans la dégradation ciblée des acides aminés problématiques. Or, certaines souches de bactéries lactiques pourraient jouer un rôle clé en tant que probiotiques, en produisant des enzymes capables de transformer des acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine ou la cystéine, dont l'accumulation peut être délétère. Ce lien potentiel entre activité enzymatique spécifique et bénéfices physiologiques pour l'hôte reste encore peu exploré. Ce travail s'inscrit dans cette perspective et cherche à répondre à une question centrale : **quelles souches de bactéries lactiques présentent à la fois des capacités enzymatiques ciblées pour la dégradation de certains acides aminés et un véritable intérêt probiotique pour une application nutritionnelle ou thérapeutique ?**

Pour atteindre cet objectif, le travail a été mené selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries lactiques à partir de produits laitiers fermentés (yaourt, lben et fromage).
- Identification morphologique, physiologique et biochimique des souches isolées.
- Réalisation de tests enzymatiques pour évaluer la capacité des souches à dégrader trois acides aminés cibles : phénylalanine, tyrosine et cystéine.
- Analyse des résultats enzymatiques afin de déterminer le profil métabolique de chaque souche.
- Interprétation des données pour évaluer le potentiel technologique et probiotique des souches identifiées, en vue de leur application dans la bioconversion et la gestion des troubles métaboliques.

# Synthèse Bibliographique

# **CHAPITRE 1**

## **Les bactéries lactiques**

## 1. Définition

Les bactéries lactiques, également connues sous le nom de bactéries de l'acide lactique (LB), représentent une catégorie très variée de micro-organismes partageant différentes caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. La particularité majeure de ces organismes est leur capacité à produire des quantités significatives d'acide lactique, qui constitue le principal produit de leur métabolisme fermentaire (**Marshall et Law, 1984 ; Axelsson, 1993**).

**Orla-Jensen** a été le premier à définir le concept du groupe en **1919**. Cela concerne des souches qui ne sont ni pathogènes, ni toxinogènes (**Garry et al., 1999**). On recense 13 genres distincts au sein des bactéries lactiques, à savoir : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. (**Dortu, 2009**). Selon **Kandler et Weiss (1986)**, ces bactéries peuvent transformer les sucres tels que le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose et le lactose en acide lactiques.

Ces organismes contribuent à la fabrication de divers produits alimentaires fermentés (**Guetarni, 2013**), c'est la raison pour laquelle ils sont parfois nommés « ferments lactiques », « levains » ou encore « starters » (**Garry et al. 1999**).

Les bactéries lactiques constituent une catégorie de bactéries utiles, présentes tant dans l'environnement naturel que dans le système digestif humain. Elles sont employées dans l'alimentation humaine depuis des milliers d'années. Dans le secteur agroalimentaire à l'heure actuelle, les bactéries lactiques tiennent un rôle prépondérant parmi les auxiliaires de production. Bien qu'elles soient principalement reconnues pour leur contribution à l'industrie laitière (**Dortu & Thonart, 2009 ; Moraes et al. 2010**), elles sont aussi employées dans le processus de salage des légumes, la conservation des viandes et poissons, la production de pain et dans l'élaboration du vin. Elles possèdent généralement le statut GRAS (**Vescovo et al. 1996**).

## 2. Origine et habitat

Les bactéries lactiques ont pour origine les plantes vertes. Grâce à des processus d'évolution et d'adaptation, elles ont réussi à coloniser divers environnements et se retrouvent

Ainsi dans différents habitats, tant qu'ils offrent les conditions appropriées pour subvenir à leurs besoins nutritionnels (Fenton, 1987 ; Kelly *et al.* 1998 ; Carre *et al.* 2002).

Selon **Mechai (2009)**, les bactéries lactiques sont omniprésentes et elles habitent divers environnements écologiques. Elles existent en liberté dans leur environnement ou cohabitent avec un hôte, comme l'être humain ou l'animal, dans un écosystème bactérien tel que le système gastro-intestinal ou génital des mammifères (Makhloifi, 2011).

On retrouve fréquemment des bactéries lactiques dans le lait et ses produits dérivés (lait fermenté, fromages, etc.) (Makhloifi, 2011). De plus, elles ont la capacité de cohabiter en symbiose entre elles et avec un hôte. Des genres de bactéries lactiques tels que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weisseilla* colonisent le tractus gastro-intestinal des mammifères.

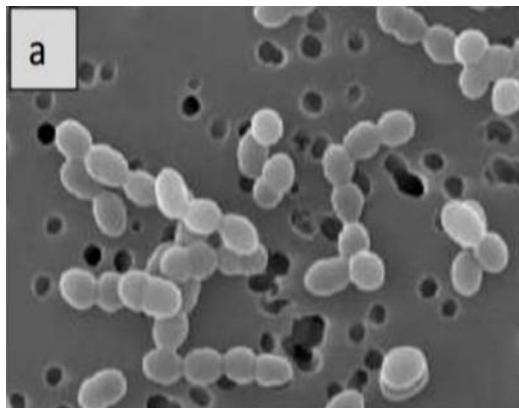
### 3. Caractéristiques des bactéries lactiques

#### a. Caractères morphologiques

L'initiale définition des bactéries lactiques (LB), qui se basait sur leur aptitude à fermenter et coaguler le lait, incluait les bactéries coliformes et lactiques. En 1901, **Beijerinck** identifie les lactobacilles comme étant des bactéries à Gram positif, établissant ainsi une distinction claire entre les bactéries lactiques (à Gram positif) et les bactéries coliformes (Mechai, 2009). Ainsi, les bactéries lactiques sont des bactéries Gram-positives, dépourvues de pigments, incapables de se déplacer et qui ne forment pas de spores. (HO *et al.*, 2007). Ils constituent un ensemble diversifié comprenant des coques ainsi que des bacilles ou bâtonnets (Badis *et al.*, 2005 ; Khalisanni, 2011).

- Les coques (Cocci) sont des structures sphériques plus ou moins ovales, variant de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leur division peut donner naissance à des paires, des tétrades, des tétrades, ainsi qu'à des chaînes ou des regroupements. Il s'agit de bactéries qui ne forment pas de spores et qui sont dépourvues de mobilité (Figure1).

- Les bacilles sont des bactéries qui se présentent sous forme de bâtonnets et peuvent adopter diverses apparences. Outre les bâtonnets droits traditionnels, on peut également observer des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles. Dans certains cas, le bâtonnet peut se courber ou se transformer en fils. Selon Hermier *et al.*, (1997), leurs diamètres varient de 0,5 à 0,2  $\mu\text{m}$  et ils possèdent une longueur d'environ 1,5 à 10  $\mu\text{m}$  (Figure 2).



**Figure 1:** la forme cocci des bactéries lactiques observe au microscope electronique a transmission 100X  
(Makhloifi, 2011)



**Figure 2:** la forme bacille des bactéries lactiques observé au Microscope électronique à transmission (Makhloifi, 2011).

### b. Caractères physiologiques et biochimiques

Les bactéries lactiques transforment le pyruvate en acide lactique afin de reconstituer le NAD<sup>+</sup> consommé lors de la glycolyse. À l'exception de quelques cas, elles possèdent les caractéristiques suivantes (Mechai, 2009) : Les bactéries lactiques se nourrissent de manière hétérotrophe et chimio-organotrophe (Klein *et al.*, 1998 ; Badis *et al.*, 2005). Ces dernières supportent des PH acides, ne contiennent pas de catalase et présentent un métabolisme strictement anaérobique ou aérotolérant (Hardie et Whiley, 1997). La température idéale pour la croissance des bactéries lactiques peut varier selon les genres, comme le montre l'exemple du *Streptococcus thermophilus* qui est thermophile.

Leur ADN affiche un taux de G + C variant de 30 à 60% (Stiles et Holzapfel, 1997) avec une dimension génomique allant de 1,8 à 3,3 millions de paires de bases (Mpb). La majorité des bactéries lactiques possèdent les gènes nécessaires pour un métabolisme respiratoire, cependant elles ne peuvent pas respirer en l'absence d'hème dans leur environnement (Lechardeur, 2011). L'hème est un élément essentiel pour le cytochrome oxydase, le dernier récepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire (Kang, 1989). Une concentration excessive d'oxygène peut être préjudiciable pour eux du fait de l'absence de chaîne respiratoire.

## 4. Classification des bactéries lactique

### 4.1. Classification morphologique et physiologique des bactéries lactique (Tableau 01)

La classification des bactéries lactiques se base principalement sur leur forme (bacilles ou coques), ainsi que sur les critères phénotypiques suivants :

- Le processus de fermentation du glucose.
- La capacité à croître à diverses températures (de 15 à 45°C).
- La spécificité de l'acide lactique produit (D, L ou DL).
- La résistance ou la sensibilité aux fortes concentrations en sel(6,5%,18%NaCl).
- La résistance à l'acidité (des PH relativement bas), au milieu alcalin ou à l'éthanol.
- La résistance aux sels biliaires.
- L'hydrolyse de l'arginine et la production d'acétoïne.
- La génération de polysaccharides extracellulaires, entre autres (Axellsson, 2004)

**Tableau 1:** Caractéristiques distinctives des différents genres de bactéries lactiques (Axellsson, 2004).

Genres	Caractères									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Carnobacterium</i>	-	-	+	-	ND	-	ND	-	L	9
<i>Lactobacillus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	D, L, DL	104
<i>Aerococcus</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	L	6
<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	L	33
<i>Lactococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	5
<i>Vagococcus</i>	-	-	+	-	-	-	+/-	-	L	6
<i>Leuconostoc</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	14
<i>Oenococcus</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D	2

<i>Pediococcus</i>	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	L, DL	10
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	+/-	-	-	-	-	L	65
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	L	4
<i>Tetragenococcus</i>	-	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D, DL	11

**1** : formation de tétrades ; **2** : production de CO<sub>2</sub> ; **3** : croissance à 10 °C ; **4** : croissance à 45 °C ; **5** : croissance à 6,5% NaCl ; **6** : croissance à 18% NaCl ; **7** : croissance à pH 4,4 ; **8** : croissance à pH 9,6 ; **9** : type d'acide lactique ; **10** : nombre d'espèces identifiées.

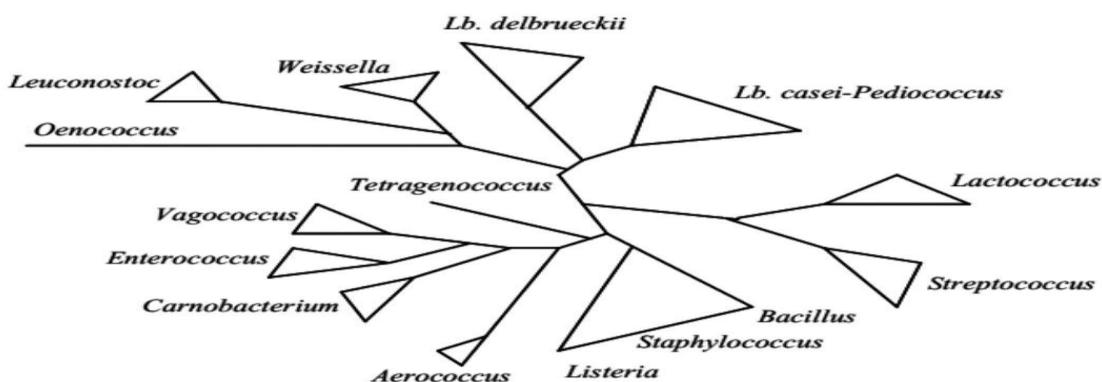
De plus, une catégorisation basée sur la composition de la paroi cellulaire, intégrant le type d'acides gras qui la constitue, a été suggérée (**de Ambrosini et al., 1996, Gilarová et al., 1994 ; König et Fröhlich, 2009**). Une autre typologie, fondée sur les produits métaboliques bactériens dérivés des glucides, a divisé les bactéries lactiques en trois catégories distinctes (**McLeod et al., 2008**).

- **Groupe I** : il regroupe principalement les *Lactobacilles* homofermentaires.
- **Groupe II** : il comprend les bactéries hétérofermentaires et rassemble les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que certaines espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.
  - **Groupe III** : comprend certaines espèces du genre *Lactobacillus* et la plupart des espèces des genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Cet organisme, qui se situe entre les groupes I et II, contient donc des espèces qui peuvent être homo- ou hétérofermentaires en fonction des conditions environnementales (**McLeod et al., 2008**).

#### 4.2. Classification phylogénétique

D'après la deuxième édition du **Manuel systématique de Bergey 2009**, les bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes, à la Classe des Bacilli et à l'Ordre des *Lactobacillales* qui comprend trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Actuellement, seuls douze genres sont exploités dans le domaine de la technologie alimentaire (**Figure 3**), à savoir : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*,

*Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Hammi, 2016). Bien que les bifidobactéries soient phylogénétiquement distinctes des LB sensu stricto (LB à faible G+C), elles sont traditionnellement considérées comme faisant partie des LB puisqu'elles partagent certaines similitudes avec ces dernières (elles génèrent de l'acide lactique et sont employées dans les produits laitiers fermentés (Mechai, 2009). Des genres tels que *Lactobacillus* et *Lactococcus* font l'objet de nombreuses études en raison de leurs activités protéolytiques liées à la décomposition des protéines et à la libération d'acides aminés.



**Figure 3:** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Hammi, 2016).

## 5. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

### 5.1. Exigences en acides aminés

Les LB nécessitent l'apport externe d'acides aminés pour leur développement, puisqu'elles ne peuvent pas effectuer la synthèse à partir d'une source azotée minérale simple. Cependant, ces exigences en acides aminés varient d'une souche à l'autre. En règle générale, *Streptococcus thermophilus* est l'espèce qui requiert le moins de nutriments (6 acides aminés au maximum), tandis que les lactobacilles sont auxotrophes pour un grand nombre d'acides aminés (Kassas, 2017).

### 5.2. Exigences en vitamines

Les nécessités nutritionnelles peuvent varier considérablement, même au sein d'une même espèce. On distingue les vitamines indispensables, celles qui favorisent la croissance et celles qui ont un effet négligeable sur la croissance. En règle générale, les besoins des LB se concentrent souvent sur les vitamines du complexe B comme la niacine, la riboflavine et l'acide pantothénique (Kassas, 2017).

## 6. Intérêt des bactéries lactiques

On utilise également des bactéries lactiques dans le secteur chimique (pour la fabrication d'acide lactique), médical et industriel en tant qu'additifs alimentaires (**Wisselink et al., 2002**).

L'association d'un ensemble diversifié de propriétés métaboliques attrayantes a mené à une multitude d'applications dans l'industrie. L'activité acidifiante, l'amélioration du goût et de la texture, ainsi que la production de substances antimicrobiennes contribuent à la préservation et à la conservation d'une multitude d'aliments fermentés tels que les fromages, le yaourt, les saucisses, le pain et l'ensilage (**Holzapfel et al., 2001**). Ces actions sont attribuées à sept genres principaux de LB : *Lactobacillus* (présent dans le lait, la viande, les légumes, les céréales), *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* (trouvé dans le lait), *Leuconostoc* (rencontré dans le lait et les légumes), *Pediococcus* (que l'on retrouve dans les légumes et la viande), *Oenococcus* (présent dans le vin) (**Klaenhammer et al., 2002**).

Bien que les genres *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Brevibacterium* ne soient pas phylogénétiquement classés dans les LB, ils sont utilisés dans le secteur agroalimentaire en raison de leurs caractéristiques semblables à celles des LB. Outre leur rôle dans le secteur de l'alimentation, et compte tenu de leurs bienfaits potentiels pour la santé, les caractéristiques de certaines variétés de LB sont actuellement exploitées à des fins probiotiques (**Fuller, 1989**). En particulier, l'utilisation de lactobacilles pour traiter l'intolérance au lactose, prévenir et réduire la durée des diarrhées causées par le Rotavirus chez les enfants, diminuer le cholestérol, réguler le transit intestinal, rééquilibrer la flore intestinale après une cure d'antibiotiques ou une infection due à un agent pathogène et soigner les maladies inflammatoires du tube digestif (**Stiles et Holzapfel, 1997**)

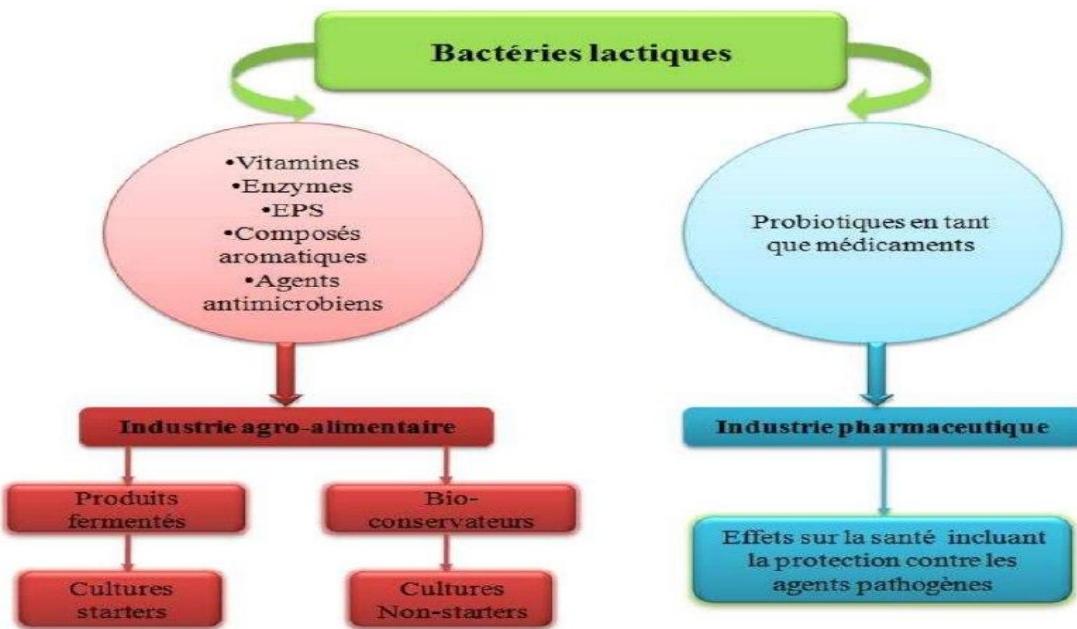


Figure 4 : les diverses applications industrielles des BL. (Florou-Paneri et al., 2013).

## 7. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques

### 7.1. Activité acidifiante

L'activité acidifiante est une activité métabolique fondamentale à l'œuvre chez les bactéries lactiques. Elle est induite par la conversion du lactose ou d'un autre sucre assimilable en acide ou elle acidifie le produit fini. Elle est, pour une part déterminante, de la capacité du lait à coaguler et, en même temps, elle garantit l'inhibition des autres germes pathogènes (Montel et al., 2005 ; Corrieu et Luquet, 2008). La plupart des bactéries présentes dans les produits laitiers possèdent un métabolisme homofermentaire, car elles génèrent presque uniquement de l'acide lactique à partir des sucres, soit quatre moles d'acide lactique produites pour une mole de lactose consommée. Toutefois, les LB thermophiles ont fréquemment des difficultés à métaboliser le galactose dérivé de la décomposition du lactose. Dans ce contexte, seules des moles d'acide lactique sont générées (Corrieu et Luquet, 2008).

### 7.2. Propriétés enzymatiques

L'un des facteurs qui entrave la croissance de LB auxotrophes pour un nombre variable d'acides aminés est la nutrition azotée car elle est présente dans le lait. Cependant, certaines espèces possèdent un système protéolytique qui leur permet d'utiliser des acides aminés formés lors de la dégradation des protéines et des peptides. Cela est particulièrement important pour la gamme de produits laitiers en ce qui concerne la production de la

consistance et du goût final. En outre, cette espèce est bénéfique car sa lipolytique est utilisée dans la fabrication de fromage (Corrieu et Luquet 2008 ; Mozzi *et al.*, 2010).

### 7.3. Propriétés probiotiques des bactéries lactiques

**Fuller, en 1989**, a avancé une définition qui se rapproche de celle d'aujourd'hui : « un complément alimentaire microbien vivant qui influence favorablement l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ». **En 2002**, la **FAO** et l'**OMS** ont établi la définition suivante : « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités appropriées, ont un effet positif sur la santé de l'hôte ». Les probiotiques ont habituellement un effet qui se manifeste, une fois en contact avec la cible, par l'inhibition des bactéries néfastes, la neutralisation des substances toxiques, l'amélioration de la capacité digestive, notamment du lactose, la réduction du taux de cholestérol sérique ou encore l'activation de l'immunité humaine (Syukur *et al.*, 2013).

D'après la définition de la FAO, les micro-organismes probiotiques sont ceux qui doivent persister dans le système digestif et avoir un impact positif sur l'hôte. Comme les bactéries sont administrées par voie orale, elles doivent surmonter les défis majeurs du passage digestif : l'acidité du PH, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques ; etc. De plus, le mot « probiotique » devrait être attribué uniquement aux microbes vivants qui démontrent une nature non pathogène, autrement dit, des microbes ayant un impact positif sur la santé (Millette *et al.*, 2008, Jankovic *et al.*, 2010).

C'est **Metchnikoff (1907)** et **Tissier (1900)** qui ont ouvert la voie en proposant les premières hypothèses scientifiques concernant l'usage probiotique des bactéries lactiques dans le cadre de leurs recherches. L'origine du terme « probiotique » provient de deux termes grecs : « pro » et « bios », signifiant respectivement « pour » et « la vie ». Ces préparations microbiennes vivantes, employées comme additifs alimentaires, exercent une influence positive sur l'hôte en favorisant une meilleure digestion et une hygiène intestinale améliorée (Mami, 2013).

Jusqu'à présent, les souches de LB considérées comme probiotiques les plus citées dans la littérature appartiennent aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Cependant, il est également important de noter les souches des genres *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Saccharomyces* (Rokka et Rantamäki, 2010 ; Gbassi *et al.*, 2010).

## **CHAPITRE 02**

# **Métabolisme des acides aminés par les bactéries lactiques**

## 1. Définition et structure générale des acides aminés :

Les acides aminés sont des molécules organiques qui constituent les monomères des protéines. Tout acide aminé est formé d'un groupe amine NH<sub>2</sub>, COOH, un atome d'hydrogène et un groupe R, leur groupe chimique une chaîne latérale. Ces groupes sont tous reliés à un carbone quant au centre, qu'on appelle carbone alpha ou carbone  $\alpha$  (Nelson et Cox, 2013). Ils sont tous obtenus selon une liaison covalente avec ce carbone ce qui leur donne un caractère amphotère, c'est-à-dire qu'ils peuvent jouer un rôle d'acide ou de base ce qui les rend hydrosolubles dans un milieu acide ou basique (selon PH de leur milieu). Ces molécules sont exprimées comme suit :



À pH physiologique, la majorité des acides aminés existent sous forme de zwitterions, avec à la fois un groupe amine protoné, conférant une charge positive à l'atome d'azote NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et un groupe carboxyle chargé négativement COO<sup>-</sup> (voet, 2016).

Les acides aminés essentiels ne peuvent pas être synthétisés par le corps humains. Certaines protéines ne peuvent être synthétisées par l'organisme et doivent donc être apportées par l'alimentation. C'est notamment le cas de la leucine, de l'isoleucine ou de la phénylalanine (Stryer, 2002). Bien que leur rôle soit surtout métabolique, les acides aminés interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques. En effet, ils servent à la biosynthèse des neurotransmetteurs, des hormones mais aussi à la régulation du métabolisme énergétique par leur dégradation partielle dans le foie (Nelson et Cox ,2013).

D'autres propriétés importantes de ces composés sont :

- Validité bidimensionnelle et solubilité dans l'eau est généralement bonne en raison de la polarité des groupes fonctionnels.
- Capacité à former des liaisons hydrogène, ioniques ou hydrophobes dans les structures tertiaires des protéines.
- Comportement face aux UV : seuls les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) absorbent significativement à 280 nm, permettant leur quantification par spectrophotométrie.

## 2. Classification des acides aminés

Les Acides aminés peuvent être classés de différentes manières, en particulier en fonction de leur polarité et de leur charge ou d'un point de vue nutritionnel.

### 2.1. Classifications selon la chaîne

Un classement sémantique, basé sur la polarité et la charge du groupement R, permet de distinguer plusieurs groupes d'acides aminés selon les propriétés chimiques de la chaîne latérale (Nelson et Cox, 2013 ; Voet et Voet, 2016) :

- **Acides aminés apolaires (hydrophobes)** : leur groupe R est apolaire, le plus souvent enfoui au sein d'une protéine, Glycine, Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Méthionine, Proline, Phénylalanine, Proline, Isoleucine, Leucine, Valine, Alanine, Glycine
- **Acides aminés neutres polaires** : les acides aminés polaires non chargés les chaînes latérales polaires, mais non ionisables à un PH physiologique. La sérine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la tyrosine, la cystéine sont ses exemples.
- **Acides aminés acides (phosphoryl sur les standards biologiques)** : les acides aminés acides sont chargés négativement, leur chaîne latérale contient un groupe carboxyle ionisable à PH physiologique. L'acide aspartique Asp et la glutamique, Glu sont les exemples.
- **Les acides aminés basiques (positif)** : leur chaîne latérale porte un groupement aminé basique. La lysine, l'arginine, l'histidine sont ses exemples.

### 2.2. Classification selon le besoin nutritionnel

Du point de vue de la nutrition, les acides sont groupés dans la catégorie théorique :

- Essentiels : ne sont pas synthétisés par un organisme (Stryer, 2002) :
- Non essentiels synthétisés par un organisme humain.

## 3. Métabolisme des acides aminés chez les bactéries lactiques

### 3.1. Besoin en acides aminées

Les bactéries lactiques ne peuvent pas synthétiser tous les acides aminés dont elles ont besoin pour croître. Elles sont donc dépendantes d'un approvisionnement exogène en acides aminés ou peptides. Ceux-ci proviennent souvent de la dégradation des protéines du

lait par des protéinases et peptidases spécifiques liées à leur paroi cellulaire ou cytoplasmique (Laroute *et al.* 1983).

### 3.2. Voies générales de dégradation des acides aminés

La dégradation des acides aminés des bactéries lactiques se déroule en deux grandes étapes, comme chez d'autres organismes :

- **Elimination du groupement amine (NH<sub>2</sub>)** : Cette étape est importante car l'azote est éliminé sous forme d'ammonium (NH<sub>3</sub>), qui est toxique et doit être évacué ou converti. Cet enlèvement peut se produire par :
  - **Transamination** (transfert du groupe aminé d'un acide aminé à un acide  $\alpha$ -cétonique), qui est catalysé par des aminotransférases, par exemple ASAT, ALAT. Cette réaction est réversible et nécessite le coenzyme phosphate de pyridoxal (PLP). (Feraga, E., 2022)
  - **Désamination oxydative** : déshydrogénation du glutamate par des glutamates déshydrogénases, amaniques NH<sub>3</sub>,  $\alpha$ -cétoglutarate. (Feraga, E., 2022)
  - **Désamination non oxydative** : essaie des acides aminés tel que la sérine, la cystéine, la thréonine (Feraga, E., 2022).
- **Catabolisme du squelette carboné** : après élimination de l'azote, le reste de la molécule, le radical carboné sera dégradé en composés intermédiaires qui entrent dans les voies métaboliques centrales, la glycolyse et le cycle de Krebs par exemple :
  - Pyruvate [provenant de lalanine, glycine, sérine, cystéine.]
  - Acétyl-coA [provenant de la leucine, isoleucine, lys.]
  - Oxaloacétat [provenant de l'aspartic] (Berg *et al.*, 2015).

### 3.3. Voies spécifiques de dégradation chez les bactéries lactiques

- Les bactéries lactiques fermentent les glucides en premier temps, mais leur métabolisme des acides aminés est aussi essentiel à leur nutrition et à la formation de composés aromatiques dans les produits fermentés.

- Elles possèdent un système de transport pour peptides et acides aminés, et d'enzymes protéolytiques (protéinases, aminopeptidases) pour libérer les acides aminés à partir des protéines du lait. (Laroute et al., 1983)
- Les acides aminés peuvent être décarboxylés par des décarboxylases (enzymes à PLP) pour la formation d'aines biogènes (par exemple : histamine), qui sont impliquées dans les propriétés organoleptiques et occasionnellement de la toxicité. (Feraga, Dr E., 2022.)
- Des voies spécifiques pouvant être utilisées par certaines bactéries lactiques pour éliminer des composés tels que le citrate et produire des arômes (acétoïne, diacétyle)

### 3.4.Réactions couplées et environnement

- La dégradation des acides aminés peut également être affectée par le PH de l'environnement : un ph acide donne lieu à la décarboxylation, et un ph e
- Certaines bactéries strictes anaérobies (par exemple : *Clostridium*) effectuent une réaction couplée appelée réaction de Stickland, par laquelle un acide aminé est oxydé et un autre réduit, ce qui n'est pas typique pour les bactéries lactiques mais démontre la richesse des mécanismes de dégradation des acides aminés chez les bactéries. (Berg et al., 2015).

**Tableau 2:** Tableau synthétique du métabolisme des acides aminés (Feraga,2022 ; Voet&voet,2011 ; Lehninger,2013)

Étape du métabolisme des acides aminés	Description	Enzymes principales	Produits
Transamination	Transfert de NH2 entre acides aminés et cétoniques	Aminotransférases (ASAT, ALAT), coenzyme PLP	Acides $\alpha$ -cétoniques, glutamate
Désamination oxydative	Libération de NH3 à partir du glutamate	Glutamate déshydrogénase	NH3, $\alpha$ -cétoglutarate
Désamination non oxydative	Libération de NH3 de certains acides aminés (sérine, cystéine, thréonine)	Divers enzymes spécifiques	NH3
Décarboxylation	Élimination de CO2,	Décarboxylases (PLP)	Amines biogènes

	formation d'amines	dépendantes)	(ex : histamine)
Catabolisme du squelette carboné	Conversion en intermédiaires métaboliques (pyruvate, acétyl-CoA, oxaloacétate)	Divers enzymes cataboliques	Intermédiaires du métabolisme énergétique

#### 4. Mécanismes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des acides aminés par les bactéries lactiques

##### 4.1. Protéolyse et libération des acides aminés :

- **Protéinases d'enveloppe cellulaire (CEP, Cell Envelope Proteinase)** : Ces enzymes extracellulaires dégradent les protéines extracellulaires (par exemple, la caséine dans le lait) en oligopeptides peptides qui peuvent être transportés dans la cellule. (**Savijoki et al. 2021**.)
- **Peptide transport system** : Trois grands systèmes de transport acheminent les peptides au sein de la cellule : oligopeptides (Opp), dipeptides (DtpP) et tripeptides (DtpT) (**Savijoki et al., 2021**).
- **Peptidases intracellulaires** : À l'intérieur, les peptides sont hydrolysés en acides aminés libres par un ensemble d'enzymes peptidiques, telles que des endopeptidases, des aminopeptidases, des dipeptidases, des tripeptidases et des peptidases proline spécifiques. (**Savijoki et al. (2021)**.)

##### 4.2. Transamination

- Aminotransférases (transaminases) : Ce sont les enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe aminé d'un acide aminé vers un  $\alpha$ -cétonique acide, donnant un nouvel acide aminé et un acide  $\alpha$ -cétonique. Il s'agit d'une réaction réversible impliquant le coenzyme pyridoxal phosphate (PLP). (**Tang, 2023**)
- Cette étape permet d'éliminer l'azote des acides aminés et de former des squelettes carbonés disponibles dans les voies métaboliques centrales.
- 

##### 4.3. Désamination oxydative

- Glutamate déshydrogénase : Elle catalyse la désamination oxydative du glutamate, libérant de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et formant l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique, un intermédiaire clé du cycle de Krebs. (Tang, 2023)

- Cette étape est importante pour l'élimination de l'azote et la régénération des acides cétoniques.

#### 4.4. Décarboxylation des acides aminés

- Décarboxylases PLP-dépendantes : Elles catalysent la décarboxylation des acides aminés, laissant produire des amines biogènes telles que l'histamine, la tyramine, la putrescine, etc. Ces molécules attribuent des caractéristiques organoleptiques à des produits fermentés et peuvent avoir un impact sur la sécurité alimentaire. (Tang, 2023)

#### 4.5. Chemins spécifiques de catabolisme des acides aminés

- Voie de l'arginine (voie arginine déiminase ADI) : L'arginine est convertie en citrulline et en ornithine et en phosphate de carbamyle par des enzymes comme l'arginine déiminase (ArcA) et l'ornithine transcarbamylase, permettant la synthèse d'énergie et la régulation du pH intracellulaire. (Tang, 2023)
- Métabolisme du BCAA et des acides aminés aromatiques : Ces métabolites enzymatiques créent des composés aromatiques et d'autres métabolites importants à la croissance bactérienne et à la saveur. (Tang, 2023)

#### 4.6. Enzymes de racémisation

- Certaines des bactéries lactiques ont des racémases (p. ex. alanine racémase, glutamate racémase) qui transforment les acides aminés L en D, formes intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. (Lam *et al.*, 2020).

**Tableau 3** : Enzymes clés et fonctions associées dans le métabolisme des acides aminés (Feraga, 2022 ; Lehninger, 2013).

Mécanisme enzymatique	Enzymes clés	Fonction principale
-----------------------	--------------	---------------------

Mécanisme enzymatique	Enzymes clés	Fonction principale
Protéolyse extracellulaire	Cell Envelope Proteinase (CEP)	Dégradation des protéines en peptides
Transport des peptides	Opp, DtpP, DtpT	Transport des peptides dans la cellule
Hydrolyse intracellulaire	Endopeptidases, aminopeptidases	Libération d'acides aminés libres
Transamination	Aminotransférases (PLP dépendantes)	Transfert du groupement amine, formation d'acides cétoniques
Désamination oxydative	Glutamate déshydrogénase	Libération d'ammoniac, formation d'acides cétoniques
Décarboxylation	Décarboxylases (PLP dépendantes)	Formation d'amines biogènes
Voie arginine déiminase (ADI)	Arginine déiminase (ArcA), ornithine transcarbamylase	Production d'énergie et régulation du PH
Racémisation	Racémases (AlaR, GluR, AspR)	Conversion L- to D- acides aminés

## 5. Facteurs influençant la dégradation des acides aminés par les bactéries lactiques

### 5.1. pH et stress acide

Le pH du milieu est un facteur majeur. Un stress acide, fréquent dans les milieux fermentaires, modifie la morphologie, la croissance et la survie des bactéries lactiques. Ce stress impacte également l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés, notamment les aminotransférases et décarboxylases. Un pH acide a tendance à favoriser la décarboxylation des acides aminés, au cours de laquelle se forment des amines biogènes, tandis qu'un pH neutre ou basique favorisera la désamination (Tairalile et Zouyed, 2014).

### 5.2. Composition et disponibilité des nutriments

- Sources d'azotes : La disponibilité des acides aminés libres, peptides et protéines dans l'environnement est indispensable. Les bactéries lactiques utilisent ces sources pour la croissance et le métabolisme. L'ajout d'ingrédients contenant des acides aminés (extraits de levure, peptones) favorise la croissance et la dégradation des acides aminés (**Tairalile et Zouyed, 2014**).
- Sources de carbone : le niveau et la composition glucidique ont une influence indirecte sur la dégradation des acides aminés, dans la mesure où ils irriguent le milieu bactérien en énergie. Une source glucidique informée favorise la croissance et l'activité enzymatique. (**Tairalile et Zouyed, 2014**)
- Vitamines et bases azotées : Certaines vitamines et bases azotées sont nécessaires au développement de bactéries lactiques et sont capables de moduler l'activité enzymatique qui est impliquée dans le métabolisme des acides aminés. (**Tairalile et Zouyed, 2014**)

### 5.3. Température

La température exerce son influence sur la vitesse de croissance bactérienne, l'activité enzymatique et la lyse cellulaire. Par exemple, une température augmentée activerait la lyse des bactéries lactiques qui libéreraient des enzymes protéolytiques et autolysines favorisant l'augmentation de la libération d'acides aminés libres à partir des protéines (**Monnet et Juillard, 2009**)

### 5.4. Autolyse bactérienne

L'autolyse contrôlée des bactéries lactiques déclenche la libération d'enzymes protéolytiques (autolysines) qui hydrolyseront les protéines en peptides et acides aminés. Il s'agit là d'un phénomène sensible à des facteurs tels que la température, le PH, la teneur en ions, et la présence de certaines molécules (trypsine, acides lipotéichoïques). (**Monnet et Juillard, 2009**)

### 5.5. Phase de croissance et conditions de fermentation

La désintégration des acides aminés est bivalvable selon la phase de croissance bactérienne. Par exemple, la synthèse de certaines enzymes est plus favorisée en phase stationnaire. Les conditions de fermentation (aérobiose/anaérobiose, répartition du milieu, température) modulent également cette activité (**Dortu et Thonart, 2009**).

### 5.6. Stress environnementaux

- Outre le stress acide, d'autres stress, tels que le stress osmotique ou la carence nutritionnelle, peuvent altérer l'expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation des acides aminés et influencer leur activité (**Tairalile et Zouyed, 2014**).

## 6. Produits finaux du métabolisme de dégradation des acides aminés

La dégradation des acides aminés au sein de l'organisme (ou des micro-organismes tels que les bactéries lactiques) conduit à la formation de produits finaux de dégradation de divers panels de produits. Une production maximum dépend de la nature de l'AA, des enzymes concernées, des conditions physiologiques ou environnementales. Chez les organismes supérieurs, le métabolisme des AA prolifère généralement à la désamination oxydative, entraînant la conversion du groupe amine en l'ammoniac libre NH<sub>3</sub> qui est ensuite transformé en urée par le cycle de l'urée ce qui se produit chez les uréotéliennes telles que l'homme (**Nelson & Cox, 2013**).

Du point de vue énergétique, le carbone des acides aminés peut pénétrer dans des voies centrales telles que la glycolyse, la voie de Krebs, ou la gluconéogenèse, selon les cas :

- **Les acides aminés glucogéniques** : les acides aminés glucogéniques tels que l'alanine et la glutamine donnent du pyruvate,  $\alpha$ -cétoglutarate, succinyl-CoA, ou oxaloacétate, pour la production de glucose.

- **Les acides aminés cétogéniques** : la leucine et la lysine sont convertis en acétyl-CoA ou en corps cétoniques : acétoacétate,  $\beta$ -hydroxybutyrate.

- **D'autres acides aminés sont à la fois glucogéniques et cétogéniques, à l'exemple de phénylalanine et tryptophane.**

Dans les bactéries lactiques, la fermentation des acides aminés entraîne également la formation de produits secondaires comme :

- Ammoniac (NH<sub>3</sub>), par désamination.
- Amines biogènes (histamine, tyramine, putrescine, cadavérine) par décarboxylation (**Spano et al. 2010**).
- Acides organiques (acétate, formiate, lactate).

- Aldéhydes et alcools (produits d'arômes).
- Gaz (CO<sub>2</sub>) comme sous-produit de certaines décarboxylations.

Ces composés peuvent jouer un rôle métabolique, technologique (dans les fermentations) ou toxicologique (par exemple, accumulation d'amines biogènes dans les aliments fermentés).

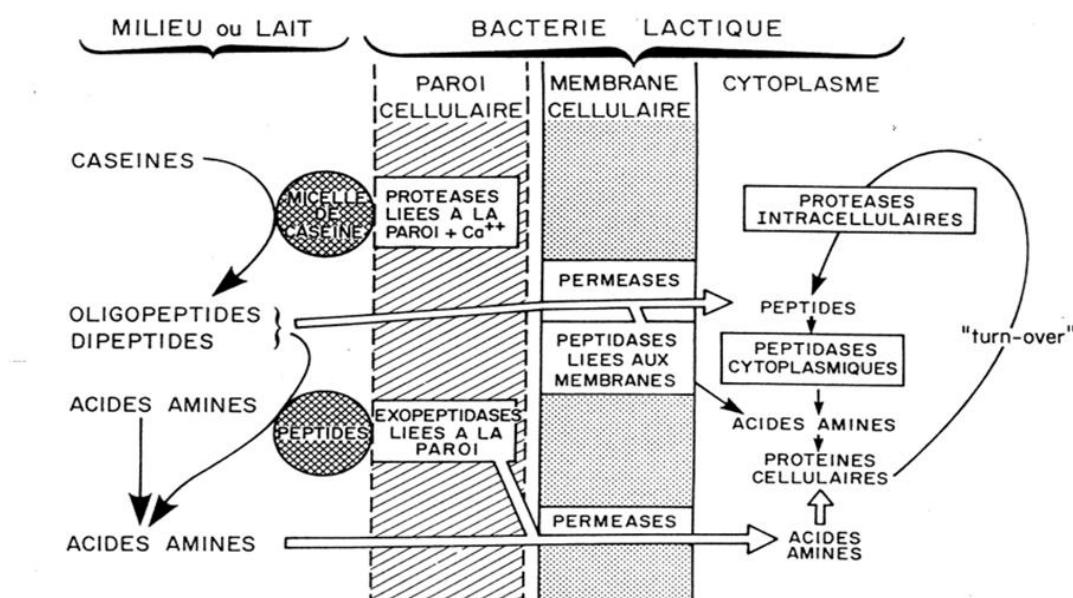
## 7. Impacts de la dégradation des acides aminés

La dégradation des acides aminés a plusieurs impacts importants, notamment dans le contexte des fermentations alimentaires :

- Production de composés aromatiques : la dégradation des acides aminés par les micro-organismes lors de la fermentation conduit à la formation de composés aromatiques tels que le diacétyle et divers acides organiques. Ces composés jouent un rôle clé dans les propriétés organoleptiques (arôme, saveur) des aliments fermentés et peuvent aussi avoir des effets bénéfiques sur la santé (**Smit et al., 2005**).
- Formation d'amines biogènes : les amines biogènes sont des substances physiologiquement actives formées par décarboxylation enzymatique des acides aminés. Parmi elles, l'histamine et la tyramine sont les plus connues et peuvent avoir des effets négatifs sur la santé à haute dose, notamment des réactions allergiques ou hypertensives. La formation d'amines biogènes est particulièrement importante dans les aliments fermentés comme certains fromages affinés, où leur concentration peut dépasser les seuils toxiques. Cependant, ces amines sont généralement dégradées dans l'intestin par des enzymes spécifiques, ce qui limite leur impact sauf en cas d'apport excessif, d'hypersensibilité individuelle ou de prise de médicaments inhibant leur dégradation (**Mack, 2009**)
- Importance dans les fermentations alimentaires : la dégradation des acides aminés est un processus clé dans la maturation et la conservation des aliments fermentés. Les métabolites issus de cette dégradation contribuent à la sécurité alimentaire par leurs propriétés antimicrobiennes et à l'amélioration des qualités sensorielles des produits. Toutefois, la gestion des amines biogènes est essentielle pour prévenir les risques sanitaires liés à leur accumulation. (**Lorenzo et al., 2017**).

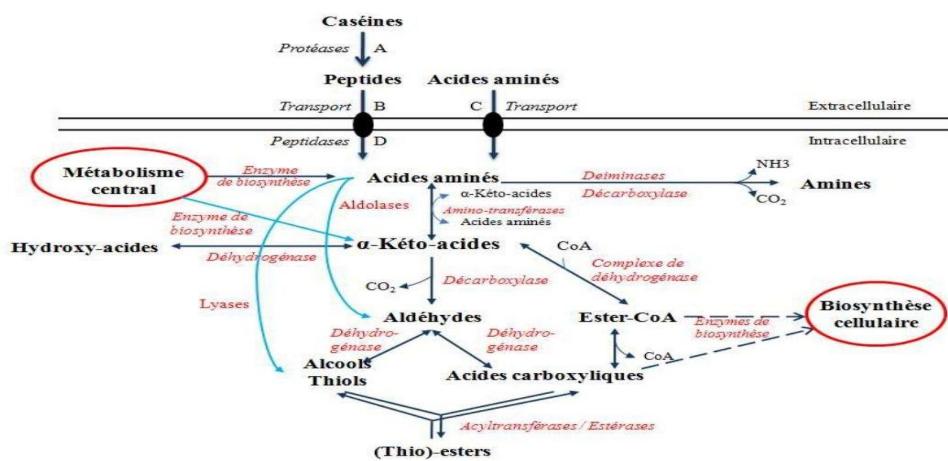
## 8. Pouvoir et activité protéolytique des bactéries lactiques

L'activité protéolytique constitue l'une des fonctions clés des bactéries lactiques, leur permettant d'hydrolyser les protéines en peptides et acides aminés, leurs nutriments, mais également leurs précurseurs d'arômes tels que dans les produits fermentés (Ammor et al., 2005). En condition de faible apport azoté, ce processus met en jeu un système enzymatique élaboré. Les protéases de surface hydrolysent partiellement la caséine en polypeptides, qui sont ensuite hydrolysés par des peptidases membranaires et cytoplasmiques en plus petits fragments, qui peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule et compléter ainsi la dégradation intracytoplasmique des protéines.



**Figure 5 :** Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (*Lactococcus*) (Desmazeaud, 1983).

L'intensité de l'activité protéolytique par les bactéries lactiques dépend de plusieurs facteurs environnementaux, tels que le PH, la température, la concentration en protéines, le type de substrat et la lignée bactérienne (Law et Kolstad, 1983 ; Desmazeaud, 1996 ; Christensen et al., 1999 ; John, 2014). Dans le cas des lactobacilles ces enzymes sont localisées soit à l'extérieur de la cellule (associées à la paroi), soit à l'intérieur (Lopez, 2008). Les protéases et peptidases sont classées selon leurs besoins en ATP, selon la nature du site actif ou la spécificité d'hydrolyse. (Figure 6) (Yvon et Rijnen, 2001 ; Singh et al., 2003 ; Yvon, 2006).



**Figure 6 :** aperçu des voies générales de conversion des protéines pertinentes pour la formation d'arômes dans les fermentations laitières (Smit *et al.* 2005).

## 9. Intérêt technologique de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont des systèmes importants dans les procédés de maturation des produits qui donnent aux aliments leurs différentes propriétés et caractéristiques organoleptiques la texture, la saveur des aliments et la production de composés aromatiques et l'utilisation de ces bactéries en industrie alimentaire est déterminée par leur propriétés technologiques (Law et Kolstad, 1983 ; Ennadir *et al.*, 2014). Les bactéries lactiques jouent donc un rôle essentiel dans la fabrication fromages et de laits fermentés. Elles interviennent par la production d'acide lactique et elles participent à la production de composés d'arômes ou de leurs précurseurs (Desmazeaud, 1983). Il est donc légitime de sélectionner les bactéries lactiques sur leur capacité à produire de l'acide lactique, et à dégrader les protéines, ce qui est l'une des caractéristiques intervenant lors de l'affinage des fromages.

## 10. Comparaison entre la dégradation des acides aminés (tableau 4)

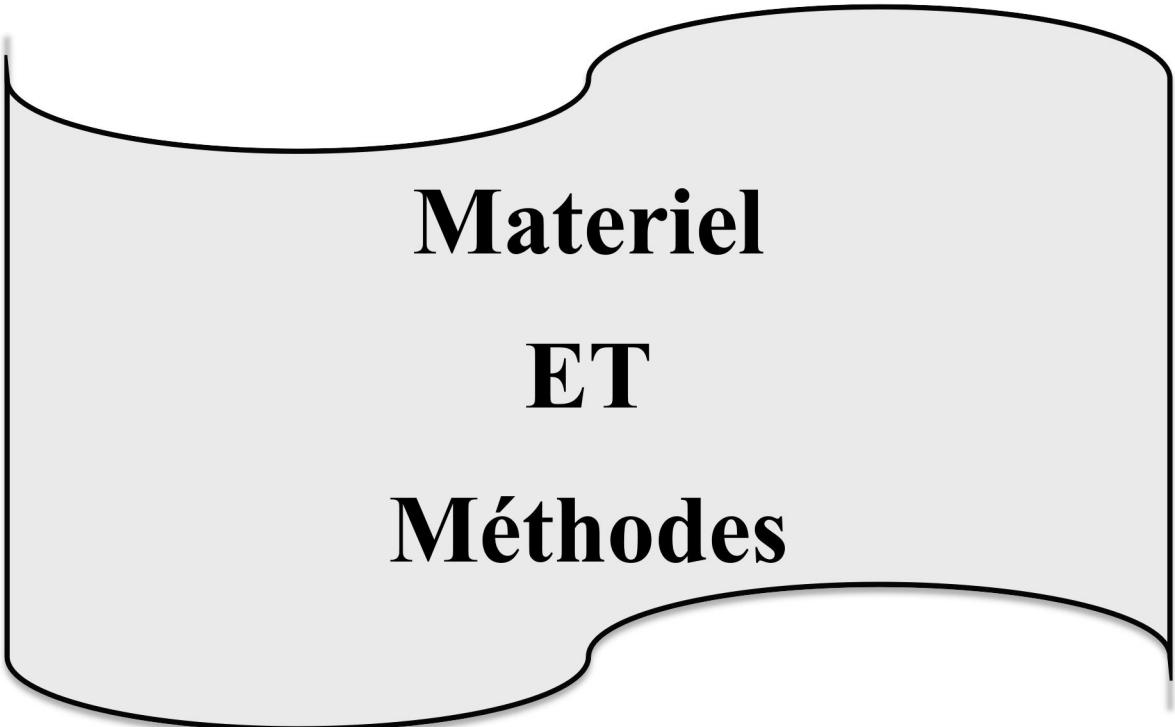
La dégradation des acides aminés varie fortement selon qu'il s'agit d'animaux eucaryotes ou de bactéries lactiques. Dans le cas des animaux, et tout particulièrement du foie, des muscles et des reins, son but premier est de fournir de l'énergie ou de préparer des précurseurs biosynthétiques afin d'alimenter le métabolisme basal et de maintenir l'homéostasie azotée. Grossièrement, la voie préconisée commence par une réaction de transamination, suivie d'une réaction de désamination donnant lieu à la création d'ammoniaque, lui-même converti en urée dans le cycle de l'urée, alors que le squelette carboné peut lui être recyclé dans divers circuits tels que le cycle de Krebs, la

néoglucogenèse ou la cétogenèse, selon les besoins de l'organisme. Les enzymes mises en œuvre dans tous ces processus sont respectivement les aminotransférases, le glutamate déshydrogénase et la carbamyl phosphate synthétase. En revanche, dans le cas des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*), les acides aminés sont transformés dans un but spécifique de production de composés aromatiques, acidification du milieu et adaptation à l'environnement. La transamination est cependant une étape initiale mais elle est suivie de réactions spécifiques selon le substrat. On produira alors l'ammoniac, des amines biogènes (tyramine, histamine), des peptides possédant une activité antimicrobienne. Le squelette carboné est dégradé en acides organiques volatils, alcools ou en arômes qui participent au développement sensoriel des aliments fermentés. Les enzymes clés de ce métabolisme bactérien sont les aminotransférases, décarboxylases, déshydrogénases et lyases. La dégradation des acides aminés dans les bactéries lactiques est donc essentielle pour la qualité du produit fermenté et pour son équilibre microbiologique. ((**Linares et al. ,2012 ; Watford, 2003 ; Brosnan & Brosnan, 2006**).

**Tableau 4:** Comparaison entre la dégradation des acides aminés normal et par bactérie

Aspect	Dégradation normale (animale/humaine)	Dégradation par bactéries lactiques
<b>Organisme concerné</b>	Cellules eucaryotes (foie, muscle, rein) ( <b>Brosnan et Brosnan,2006</b> )	Micro-organismes (ex. <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> ) ( <b>Hutkins,2006</b> )
<b>Objectif principal</b>	Produire de l'énergie ou des précurseurs biosynthétiques ( <b>Brosnan et Brosnan,2006</b> )	Produire des composés aromatiques, assurer croissance et acidification du milieu ( <b>Gobbetti et al.,2010</b> )
<b>Voie initiale</b>	Transamination puis désamination ( <b>Linares et al,2012</b> )	Transamination suivie de réactions spécifiques selon le substrat ( <b>Linares et ,2012</b> )
<b>Produit final de l'azote</b>	Ammoniaque → urée (via cycle de l'urée) ( <b>Watford,2003</b> )	Ammoniac, amines biogènes (histamine, tyramine), peptides antimicrobiens ( <b>Linares et al ,2012</b> )
<b>Utilisation du squelette carboné</b>	Cycle de Krebs, néoglucogenèse, cétogenèse ( <b>Gänzle,2009</b> )	Acides organiques volatils (acétate, propionate), alcools, arômes ( <b>Gobbetti et al.,2010</b> )
<b>Enzymes clés</b>	Aminotransférases, glutamate déshydrogénase, carbamoyl phosphate synthétase ( <b>Dufour et al.,2003</b> )	Aminotransférases, décarboxylases, déshydrogénases, lyases ( <b>Linares et al ,2012</b> )
<b>Rôle physiologique</b>	Métabolisme de base,	Développement des arômes,

	maintien de l'homéostasie azotée ( <b>Gobbetti et al.,2010</b> )	inhibition des pathogènes, adaptation au stress ( <b>Gänzle,2009</b> )
--	--	--



**Materiel**  
**ET**  
**Méthodes**

## **1. Lieu de travail**

Notre travail pratique a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie et de biologie végétale de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université des frères Mentouri – Constantine1.

Les objectifs assignés à ce présent travail s'articule autour des points suivants :

- ✓ L'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir d'un produit laitier le yaourt (nature, activia) et de fromage nature, lben « Soummam »
- ✓ La mise en évidence de la dégradation de quelques acides aminés par les bactéries lactiques isolées.

## **2. Matériel**

### **2.1 Matériel biologique**

Pour la réalisation de la partie expérimentale, on s'est servi du matériel biologique suivant :

#### **2.1.1. Le yaourt**

Le yaourt « nature et activia » a été sélectionné en tant que produit pour l'isolement des bactéries lactiques.

Les échantillons de yaourt à examiner sont maintenus à une température de +4°C pendant un maximum de 24 heures avant leur analyse.

#### **2.1.2. Le fromage et le lben**

Le fromage nature et le lben « Soummam » ont été choisis comme un produit pour l'isolement des bactéries lactique.

Les échantillons de fromage nature et de lben sont conservés à une température de +4°C pour une durée maximale de 24 heures avant d'être analysés.

### **2.2 Matériel de laboratoire**

Le matériel de laboratoire utilisé pour la réalisation de notre travail :

- MRS et M17 (liquide et solide)
- TSI
- Le milieu Clark et Lubs
- Milieu mannitol-mobilité
- Le bouillon Moeller enrichi à l'arginine ; L'ornithine
- PDA

### 3. Méthodes

#### 3.1. Traitement des échantillons

##### 3.1.1. Préparation de la solution mère

Pour chaque produit, 1 g d'échantillon est introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, le mélange réalisé est agité à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes (**Begloul, 2011**).

##### 3.1.2 Préparation des dilutions décimales

La dilution est une méthode visant à réduire la concentration d'une substance dans un liquide. Des dilutions décimales sont réalisées en série, permettant d'atteindre une dilution de  $10^{-3}$  (**Begloul, 2011**).



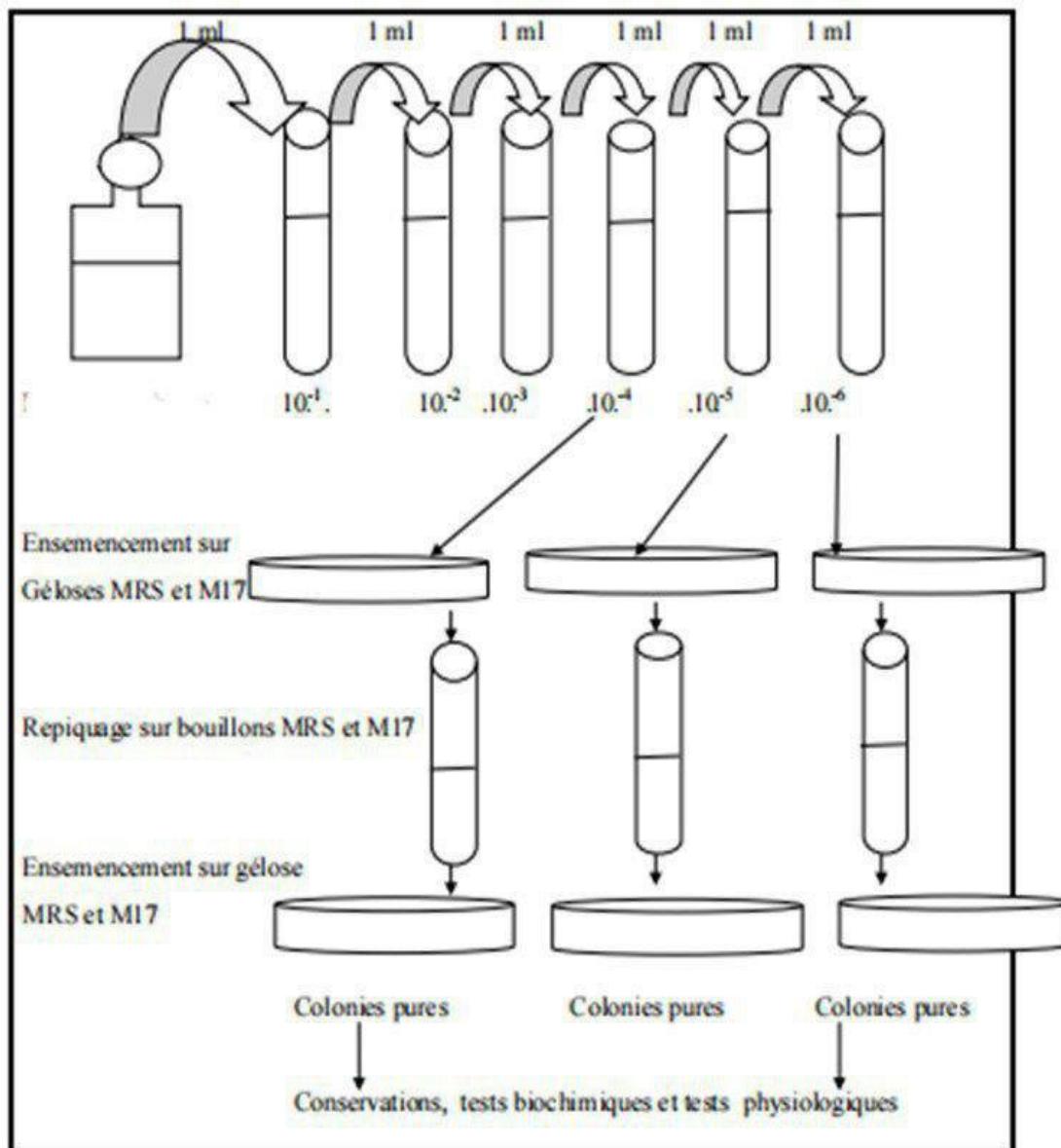
**Figure 4:** Les dilutions décimales

### 3.2. Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé en étalant 0,1 ml des différentes dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ ) sur des milieux gélosés sélectifs Man Rogosa et Sharpe (MRS) (**Annexe 1**) (M.Z.K BactChim) et M17 (**Annexe 1**) (M.Z.K BactChim), préalablement coulés et solidifiés dans des boîtes de Pétris.

L'incubation est effectuée à 37°C pendant 72 heures pendant 48 heures.

Le processus de purification s'effectue par plusieurs repiquages successifs sur des géloses MRS et M17 jusqu'à l'obtention de colonies présentant des caractéristiques identiques (souches pures).



**Figure 5:** Diagramme d'isolement des souches lactiques

### 3.3. Identification des bactéries lactiques

L'identification des bactéries lactiques se fait en analysant leurs caractéristiques morphologiques (via les examens macroscopique et microscopique) ainsi que divers caractères biochimiques : catalase, température optimale de croissance, génération de dioxyde de carbone, fermentation de divers sucres...etc.

### **3.3.1. Examen macroscopique**

L'analyse macroscopique permet de décrire l'apparence des colonies cultivées sur des milieux gélosés (MRS et M17), en prenant en considération les critères suivants : la taille, la forme, la consistance, le contour, la viscosité et la couleur des colonies (**Guiraud, 2003**).

### **3.3.2. Coloration de GRAM**

#### ❖ **Technique**

- **Préparation du frottis**
  - Déposer une goutte d'eau stérile sur la lame.
  - Prélever une colonie bactérienne avec une anse stérile et l'étaler dans la goutte d'eau pour obtenir un frottis fin et uniforme.
  - Laisser sécher à l'air libre
- **Fixation**
  - Fixer le frottis en le passant rapidement à la flamme (bec Bunsen) 2 à 3 fois ou en chauffant doucement à environ 40°C pendant 10-15 minutes. Cette étape tue les bactéries et fixe les cellules sur la lame.
- **Coloration**
  - Recouvrir le frottis de violet de gentiane (cristal violet) (Annexe 3) pendant environ 1 minute.
  - Rincer délicatement à l'eau.
  - Ajouter la solution d'iode (Lugol) (Annexe 3) sur le frottis pendant 1 minute. L'iode forme un complexe avec le violet de gentiane, fixant le colorant dans la paroi des bactéries Gram positives.
  - Rincer à l'eau.
  - Appliquer l'alcool-acétone (ou éthanol à 95%) sur le frottis pendant environ 20 à 30 secondes, jusqu'à ce que le rinçage soit clair. Cette étape élimine le violet des bactéries GRAM négatives, puis rincer immédiatement à l'eau pour arrêter la décoloration.
  - Recouvrir le frottis de safranine ou fuchsine (Annexe 3) pendant 1 minute pour colorer les bactéries Gram négatives en rose/rouge.
  - Rincer à l'eau, puis sécher la lame à l'air ou par tamponnement (**BiOutils**).

### **3.3.3. Examen microscopique**

Les colonies cultivées sur des milieux MRS et M17 sont colorées selon la méthode de coloration de Gram afin d'identifier leur morphologie (cocci et bacilles), leur disposition et leur réaction de Gram (**Guiraud, 2003**).

## **3.4. Etude physiologique**

### **3.4.1 Test de croissance à différentes températures**

Ce test sert à différencier les bactéries lactiques mésophiles des bactéries thermophiles. Les milieux MRS et M17 sont ensemencés et incubés à deux températures : 10 °C et 45 °C pendant une durée de 3 à 5 jours (**Bekhouche et Boulahrouf, 2005**).

### **3.4.2 Test de croissance à différents pH**

#### **3.4.2.1 Croissance à un pH de 9,6**

##### **❖ Principe**

L'objectif de ce test est de distinguer le genre *Enterococcus* de *Streptococcus thermophilus*. (**Bertrand, 2006**).

##### **❖ Technique**

Après inoculation dans le milieu MRS à un pH de 9,6. La culture est maintenue à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures.

##### **❖ Résultat**

L'expansion se manifeste par l'émergence d'un trouble dans le tube.

#### **3.4.2.2. La croissance à pH=5**

Elle permet d'identifier le genre *Lactobacillus* (**Hammes & Vogel 1995**). Le test est effectué par la même procédure que celle réalisée à pH=9,6. L'expansion s'accompagne également de l'émergence d'un trouble dans le tube.

### **3.4.3. Croissance sur milieu hyper salé**

#### **❖ Principe**

L'identification des bactéries est fortement influencée par la croissance à diverses concentrations de chlorure de sodium (NaCl) (**Badis et al. 2005**).

#### **❖ Technique**

Les colonies à tester sont cultivées sur des bouillons très salés de 2%, 4% et 6.5% (**Annexe2**) de NaCl et sont incubées à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures.

#### **❖ Résultat**

Selon les différentes concentrations, la croissance se manifeste par une perturbation.

### **3.4.4. Test de thermorésistance**

#### **❖ Principe**

Ce test sert à distinguer ou à détecter les souches résistantes à une température de 60°C pendant une demi-heure (**Bertrand, 2006**)

#### **❖ Technique**

Des cultures jeunes sont ensemencées sur des tubes contenant des milieux liquides (MRS ou M17) puis placer au bain-marie à 60°C pour une durée de 30 minutes, avant d'être incuber à 37°C pendant une période allant de 24 à 48 heures.

#### **❖ Résultat**

Un résultat positif se traduit par un trouble contrairement aux souches mésophiles qui ne parviennent pas à se développer, seules les souches thermophiles prospèrent (**De Roissart et al., 2006**).

### 3.5. Tests biochimiques

#### 3.5.1. Recherche de la catalase

##### ❖ Principe

La catalase est une enzyme qui favorise la décomposition du peroxyde d'hydrogène, un produit nocif du métabolisme aérobique de nombreuses bactéries, en H<sub>2</sub>O et ½ O<sub>2</sub> (Ahmed et Irene, 2007).

##### ❖ Technique

La détection de l'enzyme catalase se fait par le transfert d'une colonie prélevée des milieux MRS et M17 dans une goutte d'eau oxygénée.

##### ❖ Résultat

La production de bulles d'air résultant de l'action de l'enzyme à évaluer est le signe du dégagement de gaz.

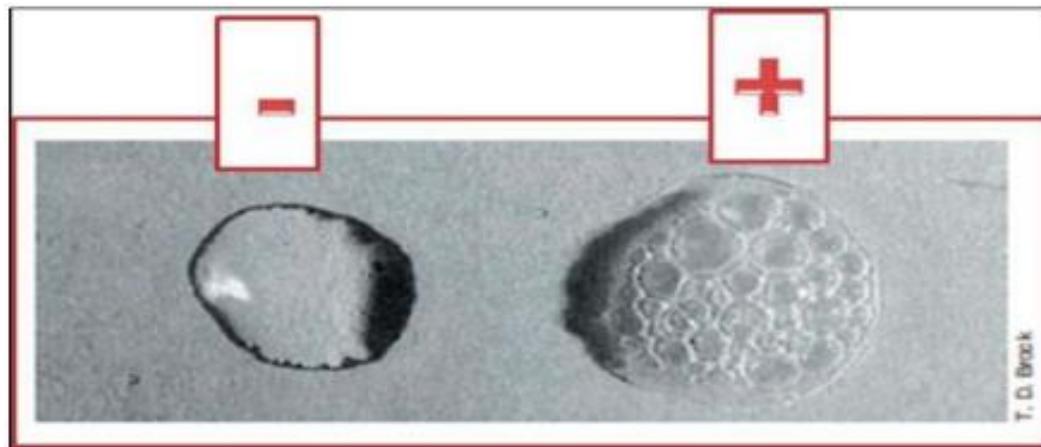


Figure 6 : test de catalase (Brock et al., 2003)

### 3.5.2. Recherche de l'oxydase

#### ❖ Principe

Cette analyse identifie une enzyme spécifique : la phénylène diamine oxydase des bactéries. Selon Guillaume (2004), cette enzyme a la capacité d'oxyder un réactif : le N-diméthyl paraphénylène diamine. (**Guillaume, 2004**).

#### ❖ Technique

On place une goutte de chaque souche cultivée au préalable sur bouillon (MRS et M17) sur le disque oxydase.

#### ❖ Résultat

La modification de couleur du disque indique un résultat positif. Si le disque adopte une teinte violette, cela signifie que l'oxydase est positive, tandis que si le disque demeure incolore, l'oxydase est négative.



Figure 7 : Réaction de l'oxydase (MacFaddin, 2000)

### **3.5.3 Identification par la galerie Api 20 E**

La galerie API 20E est une série des tests biochimiques miniaturisés qui permettent de reconnaître les bactéries en fonction de leur activité enzymatique et de leur capacité à fermenter certains substrats.

Voici les étapes principales du protocole (**Murray et al., 1978**)

- ❖ **Préparation de l'inoculum :** 5 ml de solution saline à 0,85 % est introduit dans un tube à essai stérile, puis à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, le centre d'une colonie bien isolée (2-3 mm de diamètre) est gratté, puis émulsionné soigneusement dans la solution saline.
- ❖ **Inoculation :** le bouchon du tube contenant la suspension bactérienne est retiré et une pipette Pasteur de 5 ml est insérée.
  - b) le plateau d'incubation API 20E est Incliné, puis la section tube des microtubes est rempli en plaçant l'embout de la pipette contre la paroi de la cupule.
- Remarque : Les réactions ADH, LDC, ODC, H2S et URE sont mieux interprétées si ces microtubes sont légèrement sous remplis.
- c) la section TUBE et la section CUPULE des tubes [CIT], [VP] et [GEL]. Sont remplis
- d) Après l'inoculation, la section cupule des tubes ADH, LDC, ODC, H2S et URE est rempli entièrement avec de l'huile minérale.
- e) À l'aide de l'excédent de suspension bactérienne, une gélose inclinée ou une boîte de Pétri (des milieux non sélectifs tels que la gélose nutritive, la gélose au sang ou la gélose trypticase soja sont recommandés) est inoculée pour vérifier la pureté et pour effectuer des tests d'oxydase, des sérologies et/ou des analyses biochimiques complémentaires. La gélose inclinée ou la boîte de Pétri est incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C.
- ❖ **Lecture des résultats :**
  - a) Il est nécessaire de noter toutes les réactions qui ne requièrent pas l'ajout de réactifs après 18 heures d'incubation et avant 24 heures.
  - b) Dans le cas où le tube GLU se montre négatif (bleu ou vert), l'ajout des réactifs est à éviter et l'incubation est prolongée pour une durée de 18 à 24 heures.

- c) Dans le cas où le tube GLU est positif (indiqué en jaune) :
- i. le test d'oxydase est effectué en appliquant une section de la culture bactérienne sur un papier filtre imbibé d'une goutte du réactif d'oxydase. Une réaction positive se manifestera par un passage à une couleur violet foncé en 10 secondes. Il est crucial de ne pas employer de fil en nichrome, car cela pourrait produire un résultat faussement positif. De plus, il faut s'abstenir d'utiliser des milieux sélectifs tels que Mac Conkey ou EMB pour ce test.
  - ii. les réactifs sont introduits dans les tubes TDA et VP. Pour le TDA, une réponse positive se manifeste instantanément, alors que pour le VP, elle peut mettre jusqu'à 10 minutes à se produire.
  - iii. le réactif de Kovacs est introduit dans le tube IND.
  - iv. le test de réduction des nitrates est réalisé pour tous les organismes qui sont oxydase-positifs. Il faut incorporer les réactifs dans le tube GLU suite à l'introduction du réactif de Kovacs dans le tube IND.
- ❖ **Identification :** Un profil numérique est généré à partir des résultats et comparé à une base de données commerciale pour identifier l'espèce bactérienne.

**Tableau 5:** Tableau de lecture de la galerie Api 20 E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane déaminase		Lecture indirecte		 
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte		 
VP	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
GEL	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

### 3.6. Test de la fermentation des sucres

#### 3.6.1. Utilisation du Mannitol

##### ➤ Principe

Ce test est effectué sur un milieu à base de mannitol, il a pour but d'examiner la fermentation du mannitol et de confirmer la mobilité de la bactérie. Le mannitol est un dérivé du mannose. La décomposition anaérobique du mannitol produit du fructose, dont la transformation engendre la production d'acides à chaînes courtes (Guillaume, 2004).

##### ➤ Technique

Le milieu mannitol-mobilité (Annexe 2) est inoculé par pique centrale à l'aide d'une anse de platine, puis incubé à 37°C pendant une durée de 24 heures.

## ➤ Résultat

Le centre devient jaune si le mannitol est fermenté, ce qui entraîne la propagation de la culture autour du point d'inoculation (bactérie mannitol positive et mobile). Dans le cas contraire, il n'y a pas de changement de couleur et une absence de culture au niveau du site de la piqûre (bactérie mannitol-, immobile)

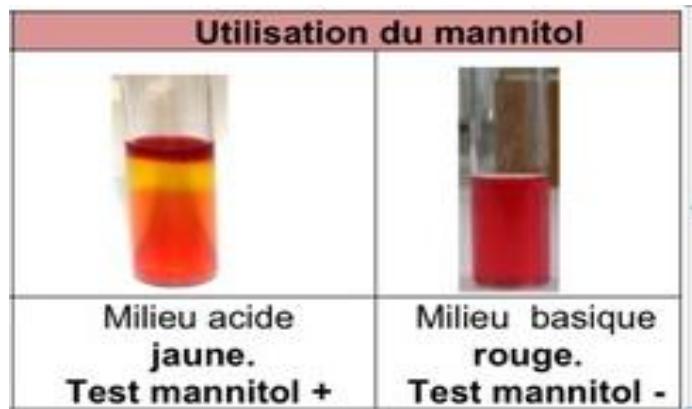


Figure 8 : Réaction du Mannitol (MacFaddin, J. F. (2000))

### 3.6.2. Utilisation des sucres : Glucose, lactose, saccharose

## ➤ Principe

Ce test effectué sur un milieu TSI (*Triple Sugar Iron*) met en lumière, d'un côté, la fermentation de trois types de sucres : le lactose, le saccharose et le glucose, avec ou sans libération de gaz, et de l'autre côté, la production d'hydrogène sulfureux ( $H_2S$ ). (Veuillez noter que la citation est anonyme).

## ➤ Technique

L'ensemencement implique une piqûre centrale du culot de la gélose TSI (Annexe 2) inclinée, ainsi que des stries denses sur la pente. L'incubation se déroule à 37 °C pendant 24 heures.

➤ **Résultat**

Une transition de couleur vers le jaune sur la pente et le culot représente la fermentation des trois types de sucres, tandis que le noircissement signale la génération d' $H_2S$ . La génération de gaz  $CO_2$  est indiquée par l'apparition de fissures dans la gélose et un détachement du culot.



**Figure 9:** Réaction des sucres : Glucose, lactose, saccharose (MacFaddin, J. F. (2000)).

**3.7. Test de dégradation des acides aminés**

**3.7.1 Test de production d'acétoïne**

➤ **Principe**

Le milieu Clark et Lubs (Annexe 2), qui renferme de l'acide pyruvique, est utilisé pour examiner les produits issus de la fermentation du glucose ; on peut ainsi distinguer la production d'acide formique et d'acide acétique (Salle, A. J. (1971)).

➤ **Technique**

La présence d'acétoïne est révélée par la méthode de Voges Proskauer (VP), en ajoutant 10 gouttes du réactif VP1 ( $\alpha$ -naphtol) et une quantité équivalente du réactif VP2 (hydroxyde de potassium).

➤ **Résultat**

La création d'un cercle rouge à la surface du milieu indique la synthèse d'acétoïne. Si le test est positif (VP+), mais si aucun anneau rouge n'est visible dans le milieu, cela signifie que le test est négatif (VP-).



### Milieu Clark et Lubs



**Figure 10 :** Réaction d'acétoïne (MacFaddin, J. F. (2000)

#### 3.7.2 Test de mise en évidence de l'arginine dihydrolase (ADH)

##### ➤ Principe

L'arginine dihydrolase est une enzyme essentielle pour la caractérisation des bactéries lactiques (Guillaume ; 2004).

##### ➤ Technique

Le bouillon Moeller enrichi à l'arginine (Annexe 2) est inoculé avec les colonies à analyser et recouvert d'une couche d'huile de vaseline afin de créer un environnement anaérobie. L'incubation se fait à la température idéale pour favoriser la croissance du germe visé sur une durée de 24 heures.

##### ➤ Résultat

Le passage de la couleur centrale du violet au jaune indique l'absence de l'enzyme (ADH-). La zone colorée en violet signale l'activité de l'arginine dihydrolase (ADH+).



**Figure 11 :** Réaction de l'arginine dihydrolase (ADH) (Cappuccino et Welsh,2019)

### **3.7.3. Test de mise en évidence de l'Ornithine décarboxylase (ODC)**

#### ➤ **Principe**

L'ornithine décarboxylase est une enzyme qui facilite la transformation de l'ornithine en putrescine, libérant du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) durant cette réaction.

#### ➤ **Technique**

Le milieu est aseptisé, puis inoculé avec la bactérie à examiner, tout en s'assurant qu'il soit sans aucune contamination. Par la suite, les tubes sont placés en incubation à 37 °C pendant une durée de 18 à 24 heures dans le but de stimuler la multiplication des bactéries. (Cappuccino et Welsh,2019)

#### ➤ **Résultat**

Si le milieu conserve sa couleur jaune après incubation, cela signifie que l'ornithine n'a pas subi de décarboxylation (ODC-).

Si le milieu change pour devenir violet, cela indique que l'ornithine a été convertie en putrescine, ce qui entraîne une alcalinisation du milieu (ODC+).



**Figure 12:** Réaction de l'ornithine décarboxylase (ODC) (Cappuccino et Welsh,2019)

### **3.7.4 Test de mise en évidence de lysine décarboxylase (LDC)**

#### ➤ **Principe**

La lysine décarboxylase est une enzyme qui facilite la transformation de la lysine en cadavérine, produisant du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) lors de cette réaction.

#### ➤ **Technique**

Introduire le milieu avec la suspension bactérienne et le placer à une température de 36°C pour une durée de 18 à 24 heures. Pour les essais LDC, il est fréquemment indispensable de générer une condition d'anaérobiose en couvrant le tube avec de l'huile de paraffine. (Cappuccino et Welsh,2019).

➤ **Résultat**

Le milieu s'assombrit et devient violet, signalant la présence de la lysine décarboxylase (LDC+). L'environnement demeure jaune, indiquant l'absence de décarboxylase de la lysine (LDC-)



Lysine  
decarboxylase  
test - Principle,  
Procedure,  
Result

**Figure 13:** Réaction de lysine décarboxylase (LDC) (Cappuccino et Welsh,2019)

### 3.7.5 Test de mise en évidence de phénylalanine désaminase

➤ **Principe**

Ce milieu (**Annexe 2**) sert à la recherche de la phénylalanine désaminase. En présence de fer III, le phénol pyruvate produit une couleur verte. (**Pierre-Yves Guillaume, 2023**)

➤ **Technique**

S'exercer à la technique du semis en pente. Après une incubation de 18 à 24 heures à une température de 37°C, une solution de perchlorure de fer est ajoutée et une réaction positive se traduit par changement de la couleur du milieu vers la couleur verte qui indique la dégradation de la phénylalanine par la phénylalanine désaminase.

➤ **Résultat**

Pente verte après ajout de perchlorure de fer : PDA +	Pente inchangée après ajout de perchlorure de fer : PDA -

**Figure 14:** Réaction de phénylalanine désaminase (Pierre-Yves Guillaume, 2023)

### 3.7.6 Test de mise en évidence de tryptophanase

#### ➤ Principe

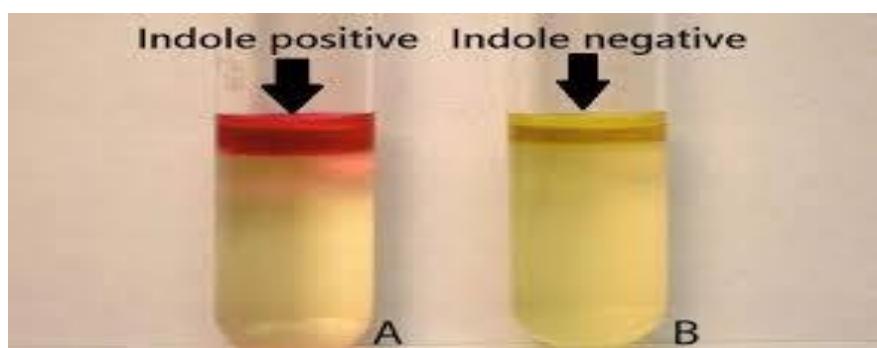
Le tryptophane est directement incorporé dans le milieu de culture ou présent dans une peptone riche en tryptophane (peptone trypsique de caséine), qui doit être dépourvue d'indole. Grâce à une réaction complexe, le tryptophane est converti en indole et autres composés lorsqu'il est décomposé par la tryptophanase.

#### ➤ Technique

L'indole peut être produite par l'hydrolyse du tryptophane à partir d'une culture de 24 heures de la souche étudiée, soit dans un milieu de Ferguson, soit dans de l'eau peptonée sans indole. (**MacFaddin, 2000**)

#### ➤ Résultat

L'indole génère une teinte rouge lorsqu'il est mélangé avec le réactif de Kovacs (paradiméthyl amino benzaldéhyde + alcool isoamylique) ou le réactif de James. La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive.



**Figure 15:** Réaction de tryptophanase (**MacFaddin, 2000**)

## 3.8. Technique de conservation

### 3.8.1 Conservation à courte durée

L'ensemencement d'une colonie sur gélose permet une conservation à court terme. Après une incubation de 24 heures à 37°C sur une gélose M17 inclinée, celles-ci sont stockées à 4°C pendant plusieurs semaines (**Saidi et al., 2002**).

### 3.8.2 Conservation sur une longue durée

Les échantillons sont conservés à -20°C dans un mélange contenant 70% de lait écrémé et 30% de glycérol (**Saidi et al., 2002**).

### **3.9.Suivi de la cinétique de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées**

Cette expérience vise à vérifier la capacité des quatre souches de bactéries lactiques isolées à dégrader trois acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) dans deux types de milieux de culture, M17 modifié et milieu minimum (**Annexe 4**) contenant ces acides aminés comme source d'azote.

Pour cela, trois colonies de chaque souche (S1, S4, S5 et S12) sont inoculées dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile, séparées et en consortium. Toutes les suspensions ont été homogénéisées par passage au vortex.

Des Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml le milieu M17 et le milieu minimum sont inoculés par les suspensions bactériennes préalablement préparées à raison de 5%. Les Erlenmeyer ont été scellés avec du coton cardé et recouverts de papier aluminium pour prévenir toute contamination. Les erlenmeyers ont été incubées à 37°C pendant 48 heures sous agitation 150 tours par minute. Des prélèvements périodiques ont été effectués pour le suivi de la décomposition des acides aminés :

**T0** : avant ensemencement

**T1** : après 22 heures d'incubation

**T2** : après 44 heures d'incubation

**T3** : après 48 heures d'incubation

Pour chaque temps de prélèvement, chaque échantillon est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes à une température de 4 °C afin de séparer les cellules bactériennes du surnageant. La décomposition des acides aminés est déterminée par mesure des absorbances des surnageant par spectrophotométrie selon les longueurs d'onde suivantes :

- La Phénylalanine à 256 nm (**Nelson et al.,2008**)
- La Tyrosine à 275 nm (**Smyth et al., (1964)**)
- La Cystéine à 220 nm. (**Fasman, 1975**)



**Figure 16:** Test de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées.



**Résultats  
Et  
Discussion**

## 1. Résultats

### 1.1. Isolement des bactéries lactiques

Après 48 heures d'incubation sur milieu M17, un total de 4 souches de bactéries lactiques ont été isolés à partir du yaourt [nature et Activia SOMMAM] et L'ban « SOMMAM », aucune colonie n'a été isolée à partir du milieu MRS.

Les colonies des bactéries lactiques sont repérées d'après leur aspect macroscopique.

La souche S1 forme de petites colonies (0,5 mm), jaunes, crèmeuses et de forme ronde et leur aspect microscopique (cocci Gram positifs, groupés en chaînes)

La souche S4 présente des colonies de grande taille (5 mm), jaunes, à texture crèmeuse à muqueuse, avec un relief convexe et leur aspect microscopique (cocci Gram positifs, en tétrades)

La souche S5 forme des colonies petites (1 mm), jaunes, rondes, avec une consistance crèmeuse à muqueuse et leur aspect microscopique (cocci Gram positifs, en paire)

La souche S12 donne de petites colonies blanchâtres, rondes et crèmeuses et leur aspect microscopique (cocci Gram positifs, groupés en chaînes.)

### 1.2. Identification des souches lactiques

#### 1.2.1. Caractères morphologiques

##### ➤ Caractères macroscopique

Les colonies isolées sur milieu M17 présentent un aspect légèrement brillant avec une couleur blanchâtre ou jaune. Elles sont de forme circulaire ou lenticulaire avec un contour régulier ou irrégulier dont le diamètre est compris entre 0.5 à 2 mm (tableau 7).

**Tableau 6:** Caractères morphologiques des bactéries lactique isolées

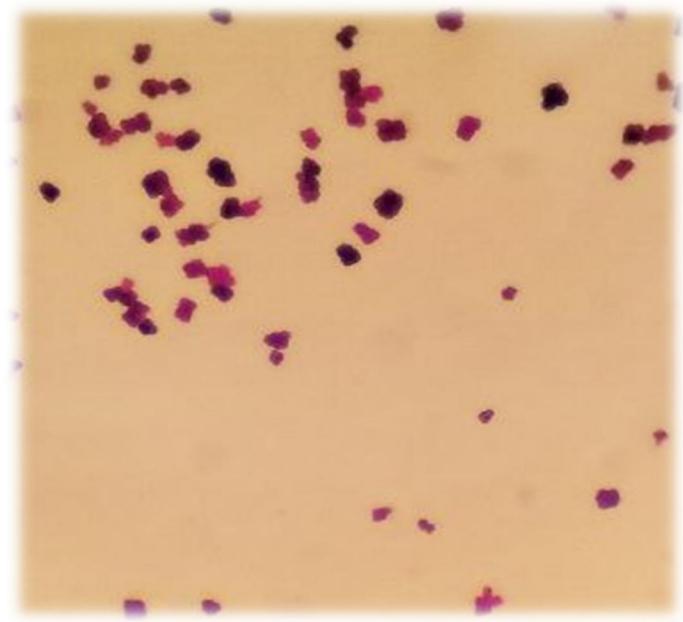
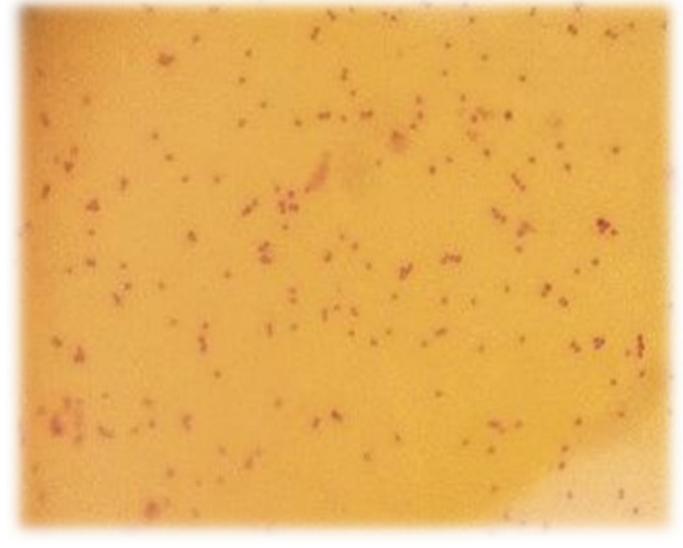
Caractère ↓ Souche	Taille	Couleur	Consistance	Aspect	Les colonnes
S1	Petit (0.5mm m)	Jaune	Crémeuse	Rond	
S4	Grand (5mm )	Jaune	Crémeuse à muqueuse	Convexe	
S5	Petite (1mm )	Jaune	Crémeuse à muqueuse	Rond	
S12	Petite	Blanchâtre	Crémeuse	Rond	

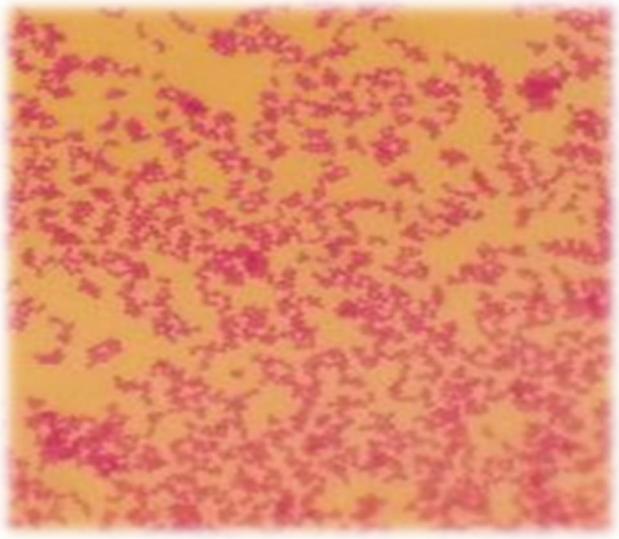
**➤ Caractères microscopiques**

L'observation microscopique d'un frottis fixé et coloré a montré que les cellules sont des coques à Gram positif, disposées en paire ou en chaînette.

**Tableau 7:** caractères microscopiques des bactéries lactiques isolées

Souches	Aspect	Figure
S1	Coque en chaînette	
S4	Coque ; En tétrades	

		
S5	Coques ; En paire	

S12	Coques ; En chaînette	
-----	--------------------------	--

### 1.2.2. Caractères physiologiques

#### ➤ Croissance à différentes températures

L'étude de la croissance des bactéries lactiques à différentes températures (45 °C et 10 °) a été réalisée en utilisant deux types de milieux de culture, à savoir M17 et MRS. Les observations indiquent que la plupart des souches examinées (S1, S4, S5, S12) affichent une bonne croissance à 45 °C dans les deux environnements, indiquant une capacité à supporter des températures élevées. Par contre, à une température de 10 °C, seule la souche S5 montre une bonne croissance sur le milieu M17, alors que les autres souches ne montrent aucun signe de croissance sur les deux milieux.

**Tableau 8:** Croissance des bactéries lactiques isolées à différentes températures

Milieux	Souche	Température	
		45°C	10°C
M17	S1	+	-
	S4	+	-
	S5	+	+

	<b>S12</b>	+	-
<b>MRS</b>	<b>S1</b>	-	-
	<b>S4</b>	+	-
	<b>S5</b>	-	-
	<b>S12</b>	-	-

+ : bonne croissance, - : pas de croissance

➤ **Croissance à différents pH :**

L'étude de la croissance des bactéries lactiques à différents pH (4,7 ; 6,5 ; 9,4), dans deux milieux : MRS et M17 révélé que toutes les souches examinées (S1, S4, S5 et S12) n'ont pas réussi à proliférer à un pH de 4,7, quel que soit le milieu MRS ou M17, ce qui souligne une sensibilité prononcée à l'acidité forte. Cependant, à des pH de 6,5 et 9,4, toutes les souches ont démontré une croissance satisfaisante sur les deux milieux, indiquant une tolérance accrue des bactéries lactiques aux conditions neutres et légèrement alcalines (**tableau 10**)

**Tableau 9:** Croissance des bactéries lactiques isolées à différents pH

<b>Milieu</b>	<b>Souche</b>	<b>PH</b>		
		<b>4.7</b>	<b>6.5</b>	<b>9.4</b>
<b>M17</b>	<b>S1</b>	-	+	+
	<b>S4</b>	-	+	+
	<b>S5</b>	-	+	+
	<b>S12</b>	-	+	+
<b>MRS</b>	<b>S1</b>	-	+	+
	<b>S4</b>	-	-	+

	<b>S5</b>	-	-	+
	<b>S12</b>	-	-	+

+ : bonne croissance, - : pas de croissance

➤ **Croissance sur milieu hyper salé**

Le test d'hypersalinité a été effectué sur les milieux M17 et MRS à différentes concentrations de sel y compris 2 %, 4 %, et 6,5 %, pour les souches S1, S4, S5 et S12. D'après les résultats obtenus, les souches S1, S4 et S5 sont sensibles aux concentrations élevées de salinité puisqu'elles ne croissent pas sur les milieux hyper salés. Alors que, la souche S12 manifeste une bonne croissance sur le milieu M17 à 2 %, 4 % et 6,5 % de salinité, indiquant sa tolérance admissible au sel dans ces conditions.

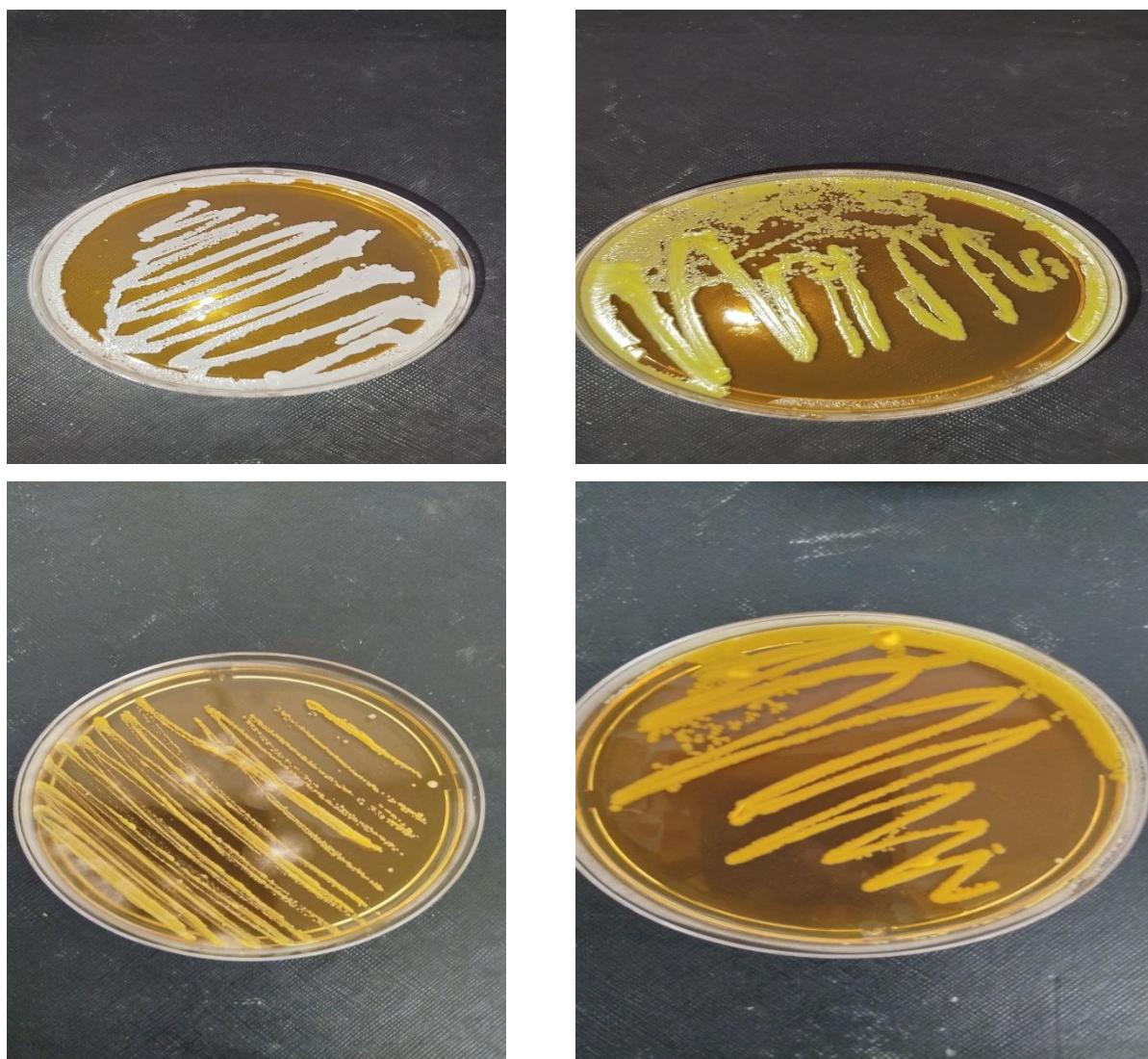
**Tableau 10:** Croissance des bactéries lactiques isolées sur milieu hyper salé

Caractères Milieux	Souche	Concentrations de sel		
		2%	4%	6.5%
<b>M17</b>	<b>S1</b>	-	-	-
	<b>S4</b>	-	-	-
	<b>S5</b>	-	-	-
	<b>S12</b>	+	+	+
<b>MRS</b>	<b>S1</b>	-	-	-
	<b>S4</b>	-	-	-
	<b>S5</b>	-	-	-
	<b>S12</b>	-	-	-

+ : bonne croissance, - : pas de croissance

➤ **Test de thermorésistante**

Le test de thermorésistante effectué à 60 °C a également révélé une différence significative entre les deux milieux de culture. Dans le milieu M17, la croissance de toutes les souches testées S1, S4, S5 et S12 est bonne. Cependant, sur le milieu MRS, à cette température, aucune des souches n'a survécu et donne un résultat négatif. (**Figure 17**) Cette variation peut être attribuée au profil nutritionnel spécial du milieu M17, qui crée ainsi un environnement plus favorable à la viabilité et à croissance des bactéries lactiques lors du stress thermique. En ce qui concerne le milieu MRS, il est généralement optimisé pour une culture à température modérée (~30-37 °C) et peut être moins approprié pour préserver l'existence cellulaire à des températures plus élevées, surtout sans la présence de certains agents de protection thermique. De plus, le M17 est souvent utilisé pour la culture de bactéries *lactocques*, connues pour leur meilleure résistance à certaines conditions stressantes, contrairement au MRS qui est conçu plutôt pour les *lactobacilles*, parfois plus sensibles à la chaleur. (**Zhang et al.,2018**)



**Figure 17:** test de thermorésistante

### 1.2.3. Caractères biochimiques

#### ➤ Test de catalase

Les résultats du test réalisé de la catalase montrent que toutes les souches testées : S1, S4, S5 et S12 sont catalase positive.

#### ➤ Test d oxydase

Les résultats du test de l'oxydase témoignent que toutes les souches testées, soit S1, S4, S5 et S12 sont oxydase négatives

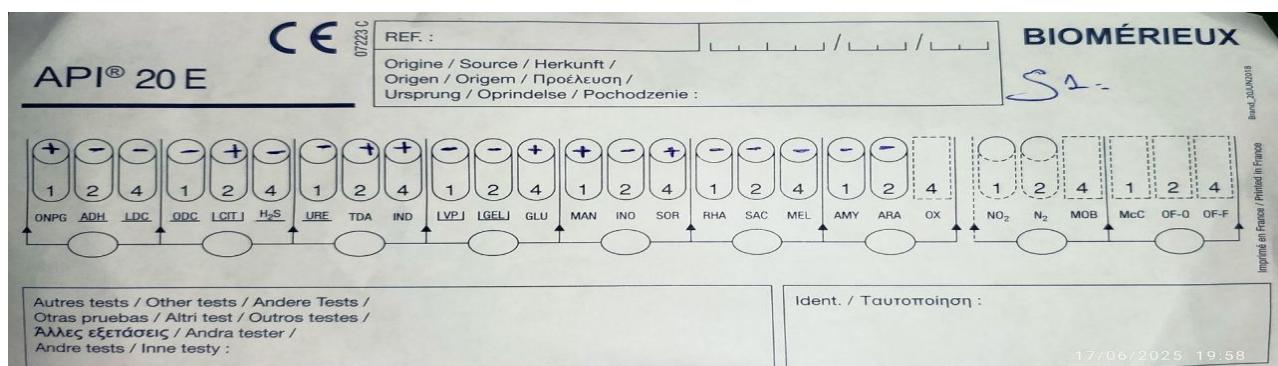
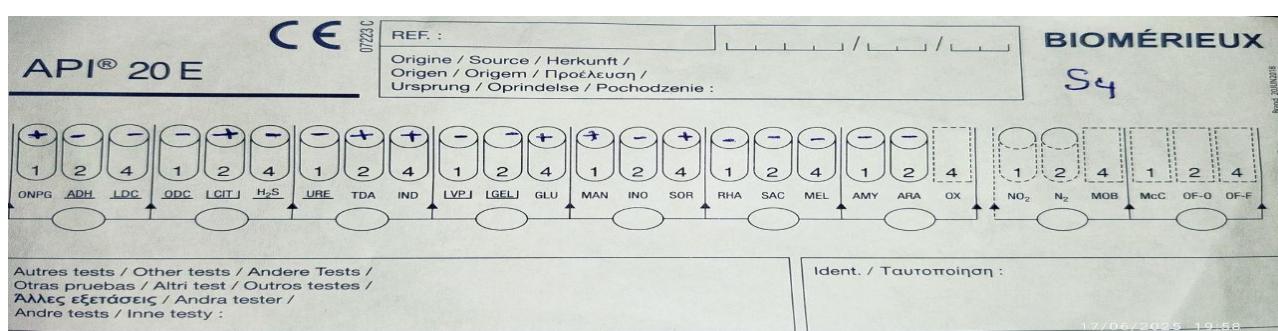
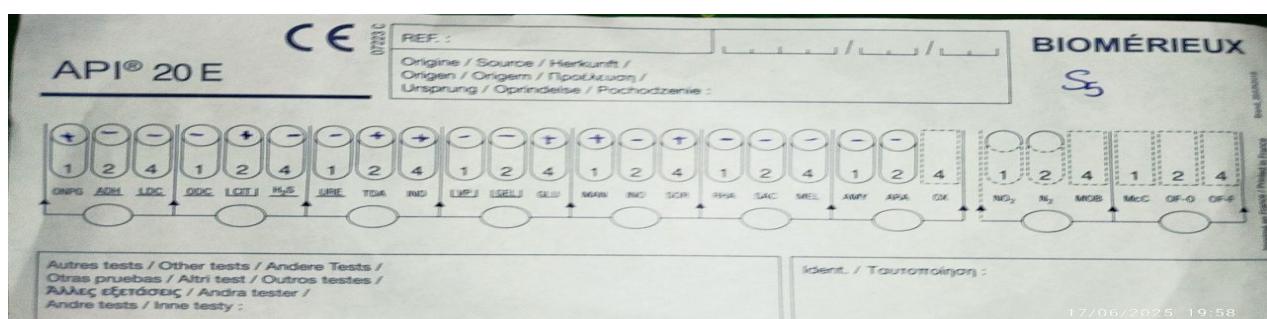
**Tableau 11:** Caractères biochimiques des bactéries lactiques isolées

Caractère Souche	Test catalase	Test oxydase
S1	+	-
S4	+	-
S5	+	-
S12	+	-
		

#### ➤ Test API 20 E :

Le bio-type à caractères biochimiques a été rendu possible par l'utilisation de la galerie API 20E, ce qui a permis d'identifier biochimiquement 4 souches bactériennes lactiques S1,

S4 ; S5 et S12. Les analyses indiquent que les quatre souches présentent un profil biochimique similaire. Les tests positifs comprenaient le ONPG, GEL, GLU, SOR, RHA, ARA, OX, et NO<sub>2</sub>. Chaque autre test effectué dans la galerie, à savoir ADH, LDC, ODC, H 2 S, URE, TDA, IND, VP, MAN, INO, SAC, MEL, AMY, N 2, MOB, McC, OF-O et OF-F ont tous testé négatif. Basé sur ce profil, il est indiqué que les souches de bactéries examinées partagent des caractéristiques métaboliques similaires. Cela comprend leur capacité à fermenter certains types de sucres, ainsi que leur capacité à générer diverses enzymes. La “liste de contrôle” montre des similitudes avec les caractéristiques métaboliques des bactéries isolées. **Figure 18** résultats de la galerie API 20 E de 4 souches bactériennes lactiques.



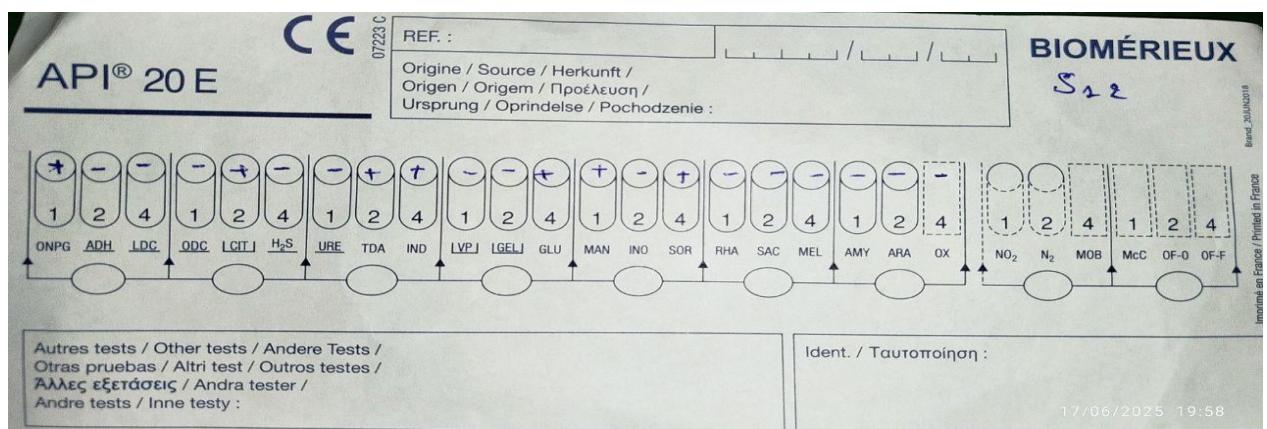


Figure 18: résultats de la galerie API 20 E de 4 souches bactériennes lactiques

- **Test de la fermentation des sucres**
  - **Utilisation du Mannitol**

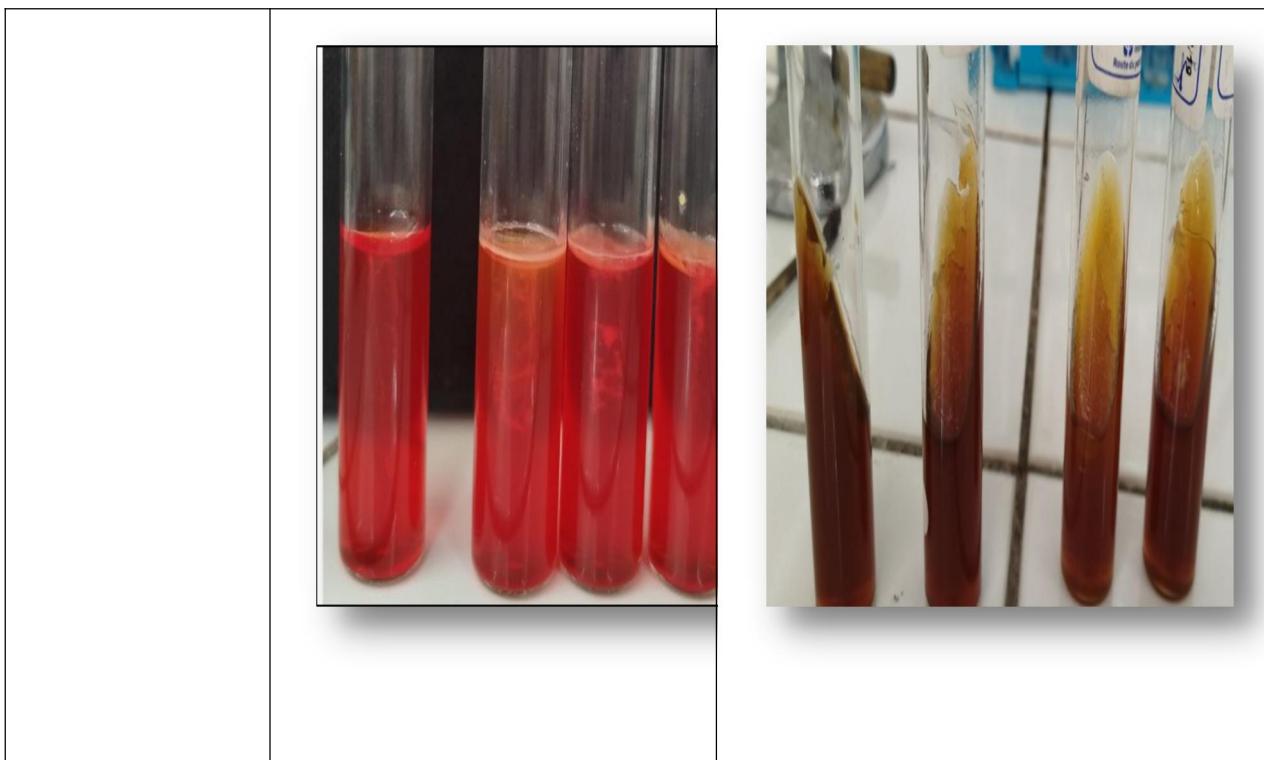
D'après les résultats obtenus, seule la souche S12 montre un résultat positif, indiquant ainsi qu'elle peut fermenter le mannitol. Par contre les souches S1, S4 et S5 ne peuvent pas fermenter le mannitol.

- **Utilisation des sucres : Glucose, lactose, saccharose**

Les tests de fermentation du glucose sur diverses souches (S1, S4, S5, S12) indiquent que toutes les souches étudiées ont la capacité de fermenter le glucose. Concernant l'émission de CO<sub>2</sub>, seules les variétés S1 et S5 sont positives, alors que S4 et S12 n'émettent pas de CO<sub>2</sub>. Aucun des isolats ne peut fermenter le lactose ou le saccharose, car toutes les souches montrent une réponse négative dans cette colonne. Au final, toutes les souches présentent une production de H<sub>2</sub>S négative, ce qui indique qu'aucune d'entre elles ne produit de sulfure d'hydrogène.

**Tableau 12:** Résultats de fermentation des sucres

Caractères Souches	Test de Mannitol		Test sur TSI			
	Mannitol		Glucose	CO <sub>2</sub>	Lactose, saccharose	H <sub>2</sub> S
<b>S1</b>	-		+	+	-	-
<b>S4</b>	-		+	-	-	+
<b>S5</b>	-		+	-	-	-
<b>S12</b>	+		+	-	-	-
	<b>S12</b>	<b>S1 S5 S4</b>	<b>S12</b>	<b>S5</b>	<b>S1</b>	<b>S4</b>



➤ **Test d'utilisation de quelques acides aminés**

- **Test de production d'acétoïne**

Les résultats des tests enzymatiques indiquent que toutes souches isolées, à savoir S1, S4, S5 et S12, harassent négatives à l'acétoïne.

- **Test de mise en évidence de l'arginine dihydrolase (ADH)**

Les résultats des tests enzymatiques Indiquent que toutes les souches S1, S4, S5 et S12, harassent négatives à l'ADH.

- **Test de mise en évidence de l'Ornithine décarboxylase (ODC)**

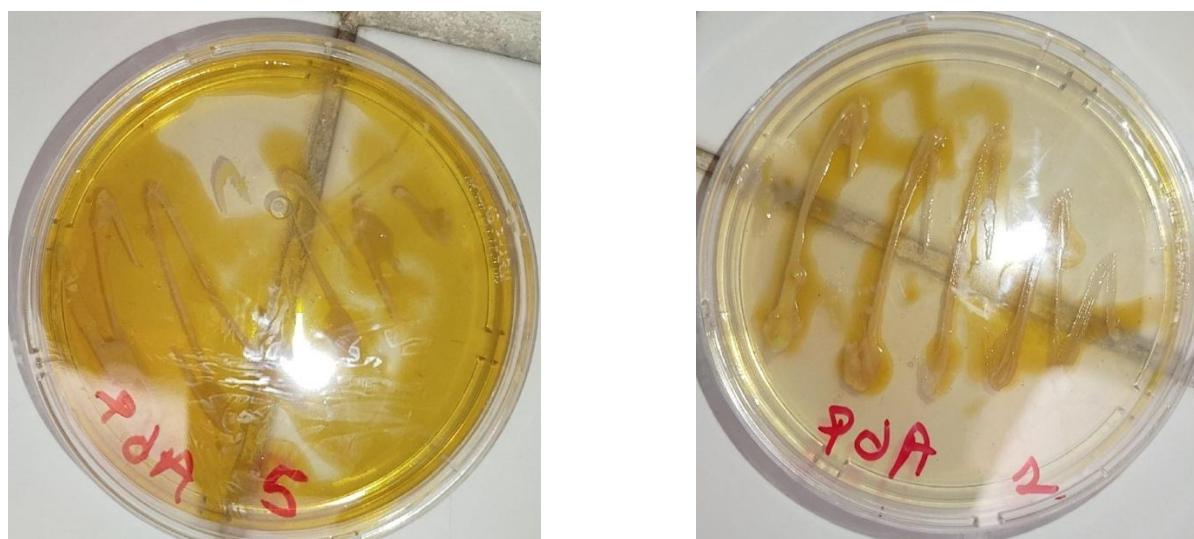
Les résultats des tests enzymatiques indiquent que toutes les souches harassent négatives pour l'ODC.

- **Test de mise en évidence de lysine décarboxylase (LDC)**

Les résultats des tests enzymatiques indiquent que toutes souches isolées, à savoir S1, S4, S5 et S12, harassent positive à la LDC.

- **Test de mise en évidence de phénylalanine désaminase**

En ce qui concerne l'activité de la phénylalanine désaminase, seule la souche S5 présente un résultat positif. Les autres souches (S1, S4 et S12) présentent un résultat négatif, indiquant qu'elles sont incapables de convertir la phénylalanine en acide phénylpyruvique.



**Figure 19:** résultat de test phénylalanine désaminase de quatre souches après l'ajout de réactif

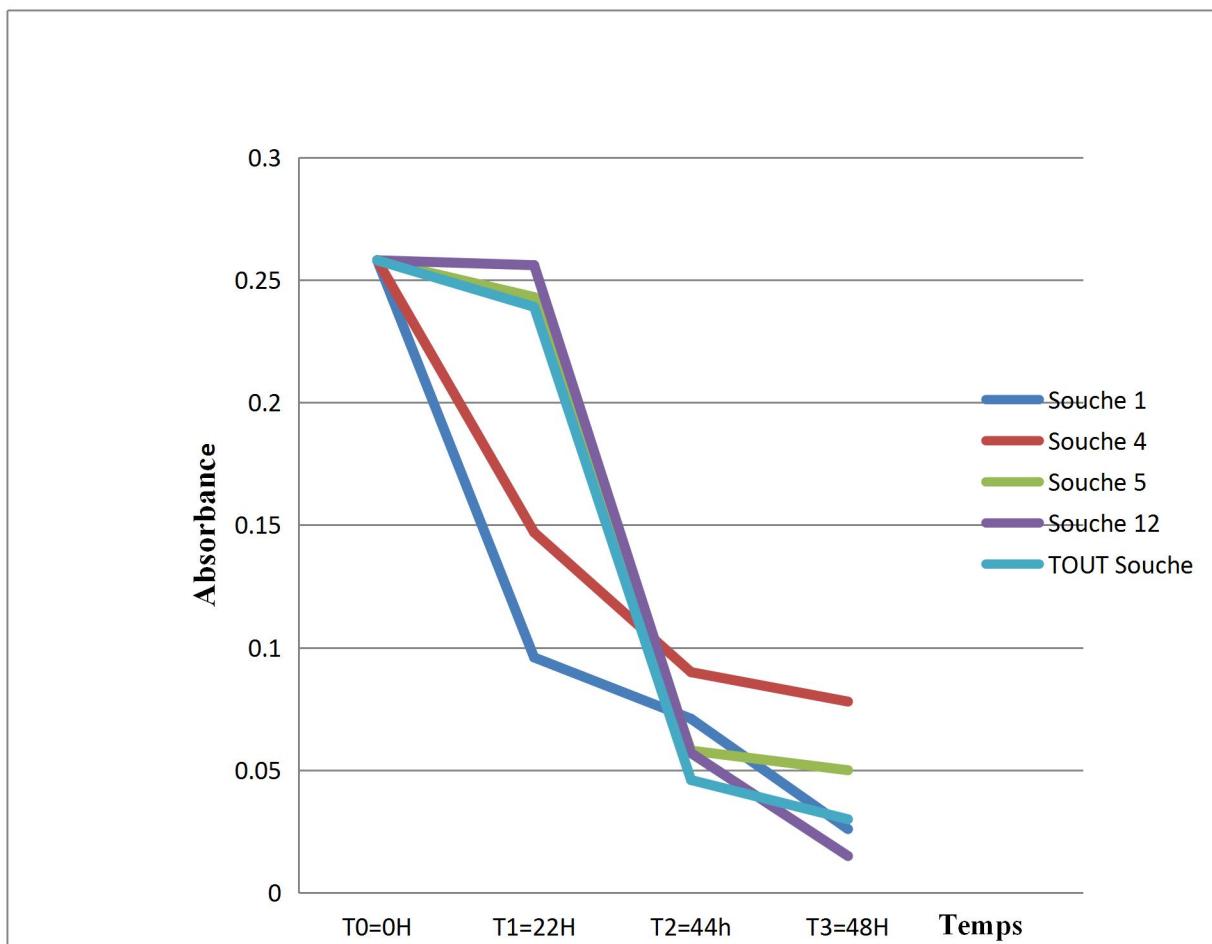
- **Test de mise en évidence de tryptophanase**

Les résultats des tests enzymatiques indiquent que toutes souches isolées, à savoir S1, S4, S5 et S12, harassent négatives au tryptophane

**Tableau 13:** Test d'utilisation de quelques acides aminés

Caractères Souches	Acétoïne	ADH	ODC	LDC	Phénylalanine désaminase	Tryptophanase
<b>S1</b>	-	-	-	+	-	-
<b>S4</b>	-	-	-	+	-	-
<b>S5</b>	-	-	-	+	-	-
<b>S12</b>	-	-	-	+	-	-
						

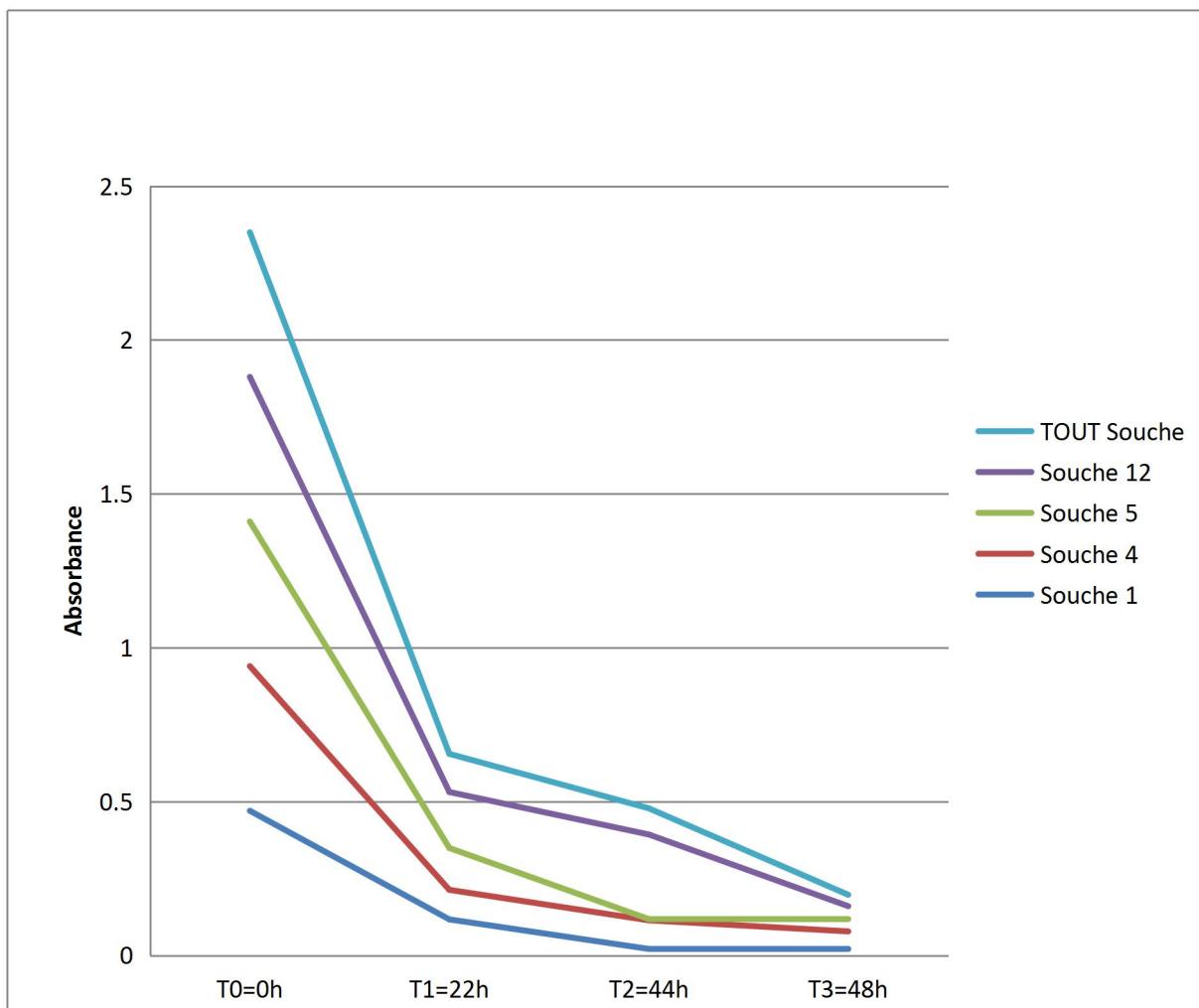
### 1.3. Suivi de la cinétique de dégradation de quelques acides aminés (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques isolées



**Figure 20:** Dégradation de la phénylalanine par des bactéries lactiques sur un milieu M17

**Tableau 14:** Absorbances du test de dégradation de phénylalanine sur milieu M17 au cours du temps

	Souche 1	Souche 4	Souche 5	Souche 12	Tout les souches
T0=0h	0.258	0.258	0.258	0.258	0.258
T1=22h	0.096	0.147	0.243	0.256	0.239
T2=44h	0.071	0.090	0.058	0.057	0.046
T3=48h	0.026	0.078	0.050	0.015	0.030



**Figure 21:** Dégradation de la phénylalanine par les bactéries lactiques sur le milieu minimum

Tableau 15: Absorbances du test de dégradation de phénylalanine sur milieu minimum au cours du temps

	Souche 1	Souche 4	Souche 5	Souche 12	Tout souche
T0=0h	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
T1=22h	0.177	0.096	0.136	0.182	0.124
T2=44h	0.021	0.093	0.004	0.275	0.085
T3=48h	0.02	0.058	0.039	0.043	0.037

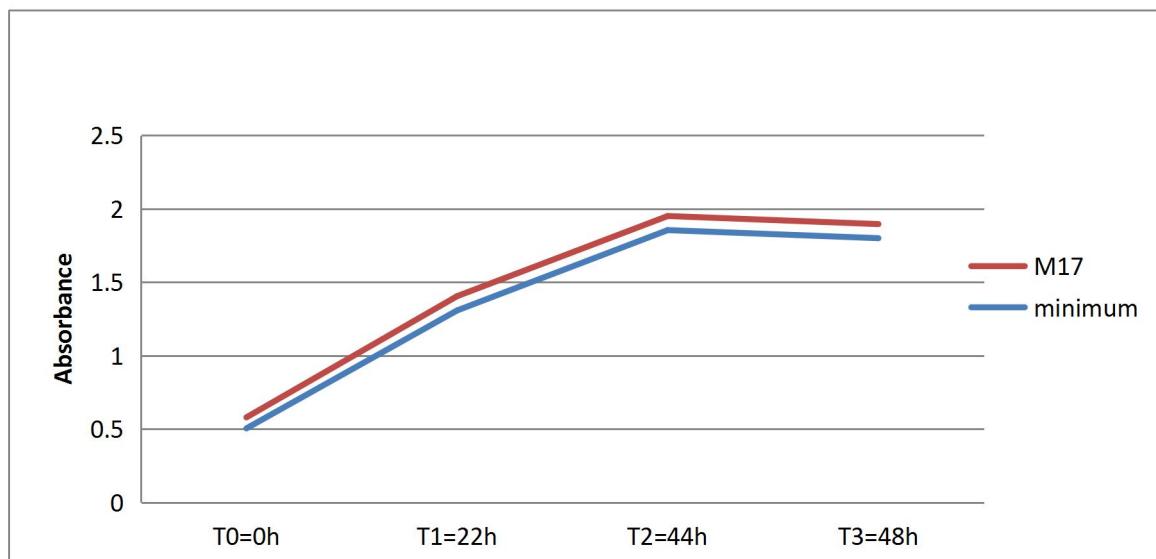


Figure 22: Dégradation de la cystine par les bactéries lactiques.

Tableau 16: Absorbances du test de dégradation de cystine au cours du temps

	Minimum	M17
T0=0h	0.505	0.075
T1=22h	1.308	0.097
T2=44h	1.855	0.096
T3=48h	1.8	0.096

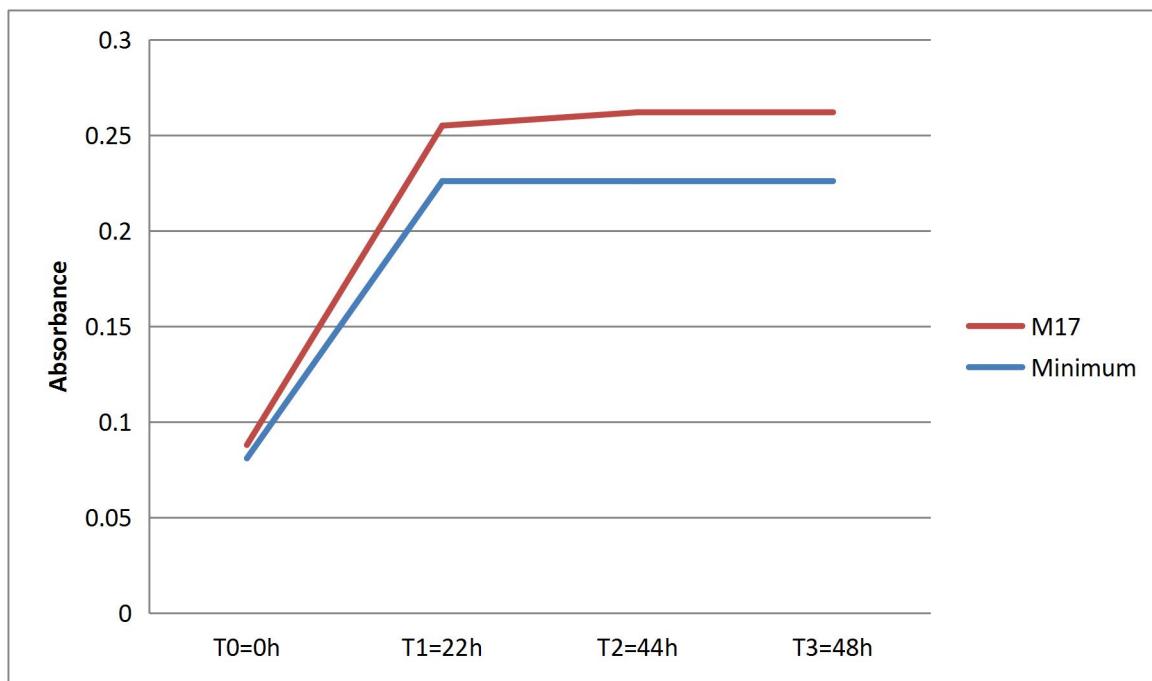


Figure 23: Dégradation de la tyrosine par les bactéries lactiques en consortium

**Tableau 17:**Absorbance de la dégradation de tyrosine au cours du temps

	Minimum	M17
T0=0h	0.081	0.007
T1=22h	0.226	0.029
T1=44h	0.226	0.036
T2=48h	0.226	0.036

## 2. Discussion

### 2.1. Identification des bactéries lactiques

Le dépistage physiologique et biochimique des souches S1, S4, S5 et S12 a permis de faire une proposition d'orientation taxonomique probable.

Globalement, toutes les souches sont mésophiles, avec une bonne croissance à 45 °C et une croissance nulle à 10 °C. Elles tolèrent un PH neutre à basique (6,5 et 9,4), mais pas acide (pH= 4,7). Ces caractéristiques sont typiques des bactéries lactiques du lait, comme elles ont été détaillées par **Guiraud, (1993) et Badis et al, (2005)**.

Les quatres souches sont catalase positive et oxydase négative, ce qui solidifie leur caractère anaérobiose facultatif (**Axelsson, 2004; Hammes & Hertel, 2006**). La non-fermentation du lactose et du saccharose par toutes les souches suggère une métabolisme restreint en glucides complexes, compatible avec certaines espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* (**Axelsson, 2004; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009**).

La fermentation du mannitol uniquement par S12, permet de circonscrire davantage les souches. Le test TSI exprime une fermentation du glucose pour toutes les souches, avec du CO<sub>2</sub> produit uniquement par S1, et H<sub>2</sub>S produit par S4. Ces résultats suggèrent des espèces métaboliquement distinctes.

L'activité enzymatique (ADH négative, ODC négative et LDC positive) et le test négatif de la phénylalanine désaminase réaffirment l'appartenance des isolats aux genres non entériques (**Moeller, 1955 ; Ewing et al., 1960 ; MicrobeOnline, s.d.**). Ces tests enzymatiques servent principalement à différencier les bactéries du groupe Enterobacteriaceae (entériques) des autres types. Les bactéries entériques telles que *Escherichia*, *Proteus* ou *Salmonella* se caractérisent généralement par être ADH<sup>+</sup>, ODC<sup>+</sup> et PDA<sup>+</sup> (Ewing et al., 1960 ; Moeller, 1955). Cependant, des genres comme *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc* sont habituellement ADH<sup>-</sup> et ODC<sup>-</sup>, avec une activité LDC fluctuante, et PDA négatif — ce qui les dégage de la catégorie entérique (**Moeller, 1955 ; MicrobeOnline, s.d.**)

En tenant compte de l'ensemble des résultats, il est probable que :

•La souche S1 appartient au genre *Lactococcus*, défini par le défaut de mobilité et une production de CO<sub>2</sub> (**Salminen et al., 1998**).

•La souche S4 se rapproche du genre *Pediococcus*, considérant sa mobilité et la production de H<sub>2</sub>S (**Axelsson, 2004**).

•La souches S5 e se rapprochent du genre *Enterococcus* et la souche S12 présentent une tolérance plus élevée à la saumure et peut-être rapprochée de plus en plus à l'espèce *Enterococcus faecium*. (**Franz et al 2011**).

## 2.2. Test de dégradation de quelque acide aminé (phénylalanine, tyrosine et cystéine) par les bactéries lactiques :

### 2.2.1. Test de dégradation de la Phénylalanine

L'analyse des courbes d'absorbance a mis en évidence une dégradation progressive de la phénylalanine par les différentes souches de bactéries lactiques testées. La diminution prononcée de l'absorbance relevée entre T= 0 h et T= 48 h pour les souches S1, S5 et S12 confirme une activité métabolique active à l'opposé de la souche S4 dont l'activité enzymatique semble moindre, suggérant une variabilité inter-souches de la capacité à utiliser la phénylalanine comme source d'azote en lien très probablement avec des différences d'expression enzymatique. L'absence d'acide phénylpyruvique (PPA) attendu de l'activité de la phénylalanine désaminase (PAD) (Test de mise en évidence de phénylalanine désaminase) indique que le métabolisme classique de désamination n'a pas été privilégié dans nos conditions expérimentales. Cette observation oriente les hypothèses vers l'existence de voies métaboliques alternatives conduisant à la formation de métabolites secondaires comme l'acide phényllactique (PLA) ou le N-lactoyl-phénylalanine (Lac-Phe), récemment décrits dans la littérature (**Zhang et al., 2022 ; Dong et al., 2023 ; Kim et al., 2024**) et produits au sein de certaines souches de bactéries lactiques, ayant démontré un effet antimicrobien et un rôle régulateur métabolique bénéfique.

De plus, les résultats individuels obtenus en milieu minimum, dans lequel la phénylalanine était l'unique source d'azote, ont confirmé chez certaines souches la capacité à métaboliser cet acide aminé, dans chaque cas, au travers d'activités enzymatiques spécifiques associées à la fois au métabolisme protéique. Cette compétence atteste d'une plasticité métabolique bien caractérisée qui pourrait être valorisée à des fins probiotiques dans des maladies héréditaires du métabolisme, comme la phénylcétonurie (PCU). Une telle intervention microbienne pourrait concourir à l'élimination intestinale de la phénylalanine, en

complément des régimes restrictifs qui constituent actuellement la recommandation thérapeutique.

Enfin, bien que l'identité exacte des métabolites formés reste à établir, cette étude ouvre la voie à l'utilisation au titre de probiotiques fonctionnels de certaines souches lactiques dans le domaine de la santé métabolique. Ces résultats viennent compléter ceux de (Ardö et al. 2007), qui avait, pour sa part, montré que le *Lactococcus lactis* transformait la phénylalanine en composés aromatiques tels que le phénylacétaldéhyde.

### 2.2.2. Test de dégradation de la tyrosine

L'analyse des courbes d'absorbance (Diagramme 04) montre une solubilisation significative de la tyrosine entre  $T = 0$  h et  $T = 22$  h, suivie d'une stabilisation.

Cette évolution peut être le résultat d'une accumulation de métabolites solubles, côté totalement dégradé de la tyrosine. Deux hypothèses principales peuvent expliquer ce fait soit d'une part, l'inutilisation de la tyrosine par les bactéries lactiques, soit d'autre part, la formation de produits secondaires non détectables par les tests colorimétriques habituels. De plusieurs de ces produits, tels que l'**acide p-hydroxyphénylpyruvique**, issu d'une désamination (Smit et al., 2005), mais encore la **tyramine**, le **p-crésol**, ou des **dérivés lactoylés de la tyrosine**, bien documentés par la littérature (Fernández et al., 2007 ; Zhang et al., 2022) et probablement synthétisés par les souches et selon les conditions de culture.

En outre, la **complexité du milieu M17** peut également interférer avec les mesures spectrophotométriques, en tant qu'indiquer Pessione (2012), ce milieu est riche en peptides, acides aminés, voire composés aromatiques qui **absorbent aux mêmes longueurs d'ondes que la tyrosine**, faussant certains résultats. Par ailleurs, certaines **activités enzymatiques non spécifiques**, d'origine bactérienne ou du milieu, peuvent **agir sur d'autres substrats et produire des métabolites d'absorption**. Donc l'**absorbance mesurée ne traduit ni uniquement la dégradation de la tyrosine**.

Or, n'est pas simplement issu d'une série de réactions biochimiques, ce qui rend une analyse d'ailleurs très complexe, car une potentielle interférence pourrait alors masquer la réelle activité enzymatique vis-à-vis de la tyrosine. Enfin, de récents travaux (Kim et al., 2024) ont fait découvrir l'intérêt fonctionnel de certains métabolites issus de la tyrosine (en particulier le **N-lactoyl-tyrosine**) pour leurs effets bénéfiques attendus sur l'inflammation ou le métabolisme énergétique que l'on ferait porter à l'enfance, chez les enfants présentant un certain nombre de troubles métaboliques des acides aminés. Cette direction ouvre des pistes

de recherche prometteuses en faveur d'une possible exploitation probiotique ciblée de certaines souches lactiques.

### **2.2.3. Test dégradation de la cystéine**

L'analyse des résultats met en lumière des comportements contrastés selon le milieu de culture utilisé. Dans le milieu minimum, on observe une augmentation significative de l'absorbance de la cystine (de 0,505 à 1,8 entre T=0 h et T=48 h), suggérant non pas une simple dégradation du substrat, mais une accumulation de produits dérivés ou une interaction chimique complexe entre les produits métaboliques et les réactifs colorimétriques. En revanche, dans le milieu M17, les absorbances restent très faibles, ce qui pourrait être signe d'un faible recours à la cystine, peut-être en raison de la richesse de ce milieu en azote, rendant son métabolisme non prioritaire. L'hypothèse la plus plausible reste celle d'une transformation de la cystine en composés soufrés colorés (thiosulfates, sulfures, acides thiocarboxyliques) fortement absorbants dans le domaine UV-visible. Cependant, ces métabolites n'ont pas été identifiés au cours de cette étude. Par ailleurs, la réduction de la cystine en cystéine avec libération de thiols pourrait également expliquer les variations d'absorbance, notamment par des interactions impliquant les réactifs mis en jeu par le milieu, comme l'ont décrit **Levine et al. (2000)** et **Ranjbar et al. (2021)**. Au terme de cette recherche, bien qu'aucune dégradation directe de la cystine ne soit reconnue, les éléments glanés au cours de cette recherche semblent se rapporter à une action biologique, voire chimique dans ce milieu minimum. A cet égard, et de manière concordante avec **Smit et al. (2005)**, les composés soufrés sont bien la clé aromatisante favorisant la formation d'arômes en cours de fermentation, comme c'est le cas dans le lait et les produits laitiers affinés.

# Conclusion

Cette recherche visait à étudier la faculté de dégradation de certains acides aminés, tels que la phénylalanine, la tyrosine et la cystéine, par des souches de bactéries lactiques isolées de produits fermentés comme le yaourt, le lben et le fromage. L'isolement et la détermination initiale de ces souches ont été effectués en utilisant des techniques microbiologiques traditionnelles comme la coloration de Gram et la culture sur des milieux sélectifs (**Ziehl-Neelsen, 2008** ; **Cappuccino et Sherman, 2014** ; **Loubière et al., 2020**).

Les essais de dégradation ont révélé que trois souches sur quatre (S1, S5 et S12), soit 75 %, étaient aptes à dégrader la phénylalanine. Par ailleurs, deux souches (S5 et S12), soit 50 %, étaient capables de métaboliser la tyrosine. De plus, deux autres souches (S4 et S12), représentant également 50 %, ont démontré une activité sur la cystéine. Ces conclusions mettent en évidence un potentiel enzymatique distinct et suggèrent une utilisation spécifique des souches en fonction de l'acide aminé ciblé. Plus spécifiquement, S1, S5 et S12 ont démontré une grande capacité à décomposer la phénylalanine. Cela laisse entrevoir des possibilités intéressantes dans le secteur des probiotiques fonctionnels, en particulier pour le traitement de la phénylcétonurie (PCU) (**Kim et al., 2024** ; **Dong et al., 2023**).

L'étude comparative des souches révèle que celles extraites du yaourt (en particulier S1) sont plus performantes sur la phénylalanine, tandis que celles issues du fromage (telles que S4) ou du lben (S12) jouent un rôle plus important dans le métabolisme de la tyrosine et de la cystéine. Cette variété fonctionnelle, associée à la provenance du produit laitier fermenté, souligne l'importance d'une sélection judicieuse de la souche en fonction de l'application technologique ou thérapeutique visée (**Kunji et al., 1996** ; **Sgarbi et al., 2020**).

Pour la tyrosine et la cystéine, l'augmentation des absorbances notée pendant les fermentations laisse supposer une accumulation de métabolites aromatiques ou soufrés qui absorbent, plutôt qu'une simple utilisation du substrat. Il existe une documentation solide concernant la formation de composés comme la tyramine, le p-crésol ou divers dérivés lactoylés à partir de la tyrosine (**Fernández et al., 2007** ; **Zhang et al., 2022** ; **Kim et al., 2024**). En ce qui concerne la cystéine, des changements en composés contenant du soufre (thiosulfates, sulfures, acides thiocarboxyliques) pourraient justifier les pics d'absorbance (**Levine et al., 2000** ; **Ranjbar et al., 2021**). Ces fluctuations peuvent aussi être dues à des interférences chimiques dans les environnements complexes employés, surtout en présence d'agents réducteurs ou de réactions dépendantes du thiol (**Smit et al., 2005** ; **Pessone, 2012**).

Du point de vue taxonomique, l'utilisation de tests biochimiques et physiologiques pour identifier les souches a conduit à leur classification dans divers genres : S1 serait associée au genre *Lactococcus*, S4 à *Pediococcus*, alors que S5 et S12 semblent plus proches des *Enterococcus* (de Vos et al., 2002 ; Fernández et Raspor, 2018 ; Yao et al., 2020). Il semble logique d'établir un lien entre le type de bactérie et le profil de dégradation : On connaît bien *Lactococcus* (S1) pour sa capacité à convertir la phénylalanine en composés aromatiques (Ardö et al., 2007), *Enterococcus* (S5, S12) est reconnu pour son métabolisme diversifié des acides aminés, y compris la tyrosine, tandis que *Pediococcus* (S4) possède des voies spécifiques au soufre.

Finalement, les résultats indiquent que certaines voies métaboliques alternatives pourraient être impliquées. L'absence d'acide phénylpyruvique (PPA) lors des tests de désaminase de la phénylalanine suggère que le métabolisme traditionnel n'a pas été favorisé. L'idée de produire du N-lactoyl-phénylalanine (Lac-Phe), récemment reconnu comme un régulateur métabolique naturel (Zhang et al., 2022 ; Kim et al., 2024), mérite d'être explorée, surtout en relation avec les souches qui peuvent décomposer la phénylalanine de manière active.

## **Références bibliographiques**

### A

- Ardö, Y. et al. (2007). Formation of aroma compounds from amino acids by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 17(7), 727–745.
- Atlan d., béal c., championier vergés m. c. ,chapot-chartier m. p., chouayekh h., cocaïgn – bousquet m., deghorain m., gadu p .gilbert c .,goiffin p., guédon e., guillouard l., guzzo j., juillard v., ladero v., lindley n., lortal s., loubière p., maguin e., monnet v., monnt v., rul f., tourdot- maréchal r., et yvon m., 2008. metabolisme et ingenierie metabolique in : bactéries lactiques de la génétique aux fermentations tec & doc, lavoisier. paris. 271 - 477.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. Wright & A. Ouwehand (Éds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3<sup>e</sup> éd., pp. 1–66). New York : Marcel Dekker.
- Axelsson, L. T.(1993). Lactic acid Bacteria: Classification and Physiology. P.164.in: Salminen S., Von Wright A, Ed. in *Lactic acid Bacteria*, Marcel Dekker, Inc; New York, Etats-université.

### B

- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D. E., & Kihal, M. (2005). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of the alpine and Saanen breeds in Algeria. \*World Journal of Dairy & Food Sciences, 1\*(1), 1–7.
- Badis, A.N., Laouabdia-Sellami, D., Guetarni, M., Kihal. and Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabie et Kabylie». Sci. Technol 23: 30-37
- Bekhouche F ., Boulahrouf A. (2005). Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. Sciences & Technologie C (23) :38-45
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009). Volume 3 : The Firmicutes. Springer
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1994). Volume 2: The Proteobacteria. Springer-Verlag.
- Biolife Italiana (2023). MR- VP Medium – Technical Data Sheet.
- Blau, N., van Spronsen, F. J., & Levy, H. L. (2010). Phenylketonuria. *The Lancet*, 376(9750), 1417–1427.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Biology of Microorganisms*, 10th Edition. Prentice Hall.
- BOUNAAMA, K. (s.d.). Potentiel inhibiteur du fromage J'ben contre certaines bactéries pathogènes [Thèse de doctorat, Université de Mostaganem].

## C

- Cappuccino J.G., Sherman N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual*, 10<sup>e</sup> éd., Pearson.
- Carr Frank J., Chill Don, and Maida Nino, 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370.
- Chapot-Chartier, M. P. (1996). Les autolysines des bactéries lactiques. *Le Lait*, 76(1–2), 91–109.
- Cogan, T. M., & Jordan, K. N. (1994). Metabolism of amino acids by lactic acid bacteria. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 33(1), 45–53.
- Corrieu G., Luquet F. M., 2008. *Bactéries lactiques de la génétique aux fermentations*. Lavoisier, Paris. 884p.

## D

- De Ambrosini, V.M., Gonzalez, S., Perdigon, G., de Ruiz Holgado, A.P. et Oliver, G (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull* 44: 2263-2267.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 3: The Firmicutes). Springer.
- De Vos, W. M., Kuipers, O. P., & Kleerebezem, M. (2002). Physiology, genetics, and biotechnology of *Lactococcus lactis*. *Annual Review of Microbiology*, 56, 513–540
- Dong, F., Ma, X., Wang, Y., Zhang, Y., & Liu, S. (2023). Characterization of phenylalanine-derived metabolites produced by lactic acid bacteria in fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 271–283.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2022-22049>
- Dong, Z. et al. (2023). Effects of Phenyllactic Acid on Fermentation Parameters and Bacterial Community. *Animals*, 13(2), 309.  
<https://doi.org/10.3390/ani13020309>
- Dortu, C., & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1), 143–154.
- Drider Dj., Prevost H. (2009). *Bactéries lactiques : Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, édition ECONOMICA, France, p1, 35, 36, 51, 53, 99.
- Dufour, E., Rognon, B., & Molimard, P. (2003). Amino acid catabolism by lactic acid bacteria: Production of aroma compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 479–487. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01865.x>

## E

- Ewing, W. H., Davis, B. R., & Edwards, P. R. (1960). The decarboxylase reactions of Enterobacteriaceae and their taxonomic value. *Public Health*

Laboratory, 18, 77–83.

## F

- Fasman, G. D. (Ed.). *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd Edition. CRC Press.
- Fenton M.P. 1987. An investigation into the sources of lactic acid bacteria in Gras silage. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 181-188.
- Feraga, E. (2022). Biochimie – Métabolisme des acides aminés. [Cours polycopié ou support de cours, non publié]. Université (ou Établissement), Département de Biologie.
- Fernández, M. A., & Raspot, P. (2018). Mobility and hydrogen sulfide production by *Leuconostoc* species during hetero-fermentative metabolism. *Journal of Dairy Microbiology*, 45(2), 85–92.
- Fernández, M., & Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155–183.
- Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2007). Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An overview. *BioMed Research International*, 2007, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2007/61385>
- Fernández, M., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2000). Amino acid catabolism in *Lactococcus lactis*: expression of amino acid decarboxylase genes and accumulation of amines. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 520–529.
- Fernández, M., Zúñiga, M., & Rodríguez, J. M. (2007). Amino acid catabolism in *Lactococcus lactis*: an essential role in cheese flavor formation. *International Dairy Journal*, 17(12), 1489–150
- Florou-Paneri, P., Christaki, E. & Bonos, E. 2013. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66, 365-378. Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H. & Neves, A. R. 2013. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 31, 764-788.

## G

- Gänzle, M. G. (2009). Lactic acid bacteria for the quality improvement and reduction of acrylamide in bread. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 675–685. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00105.x>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- García-Quintáns, N. et al. (2008). Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for the biosynthesis of aroma compounds from amino acids. *Applied*

and Environmental Microbiology, 74(12), 4035–4041.

- García-Ramírez, J. A., et al. (2024). Biocontrol of biogenic amine accumulation in cheese using bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 153, 109878. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.109878>
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Yolou, F. S. & Marchioni, E. 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*, 21, 97-102.
- Gilarová, R., Voldrich, M., Demnerová, K., Cerovský, M. et Dobiás, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., & Limitone, A. (2010). Cell–cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.019>
- GUETARNI H. (2013). Effets antibactériens des bactéries lactiques isolées à partir des laits Crus Algériens sur la croissance de *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat science de la nature et de la vie. . Oran: Université d'Oran Es-Sénia, p 36, 73.
- Guiraud JP., Rosec M. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire, édition AFNOR, France, p 93, 129.
- Guiraud, J. P. (1993). Microbiologie alimentaire (2e éd.). Dunod.

## H

- Hadef S. (2012).Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales Magister : Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et d'Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie, p 11.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin (Éd.), *The Prokaryotes* (3<sup>e</sup> éd., pp. 320–403). New York : Springer.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin et al. (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. 4, pp. 320–403). Springer. [https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_10](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10)
- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood, B. J. B. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2, *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19–54). Springer.
- Hammi, I. (2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, 132 p.

- Hardie, J.M. et Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 83: 1-11.
- Hermier, J., Lenoir, J. et Weber, F. (1997). Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
- HiMedia Laboratories. (n.d.). Mannitol Motility Test Medium M770: Technical Data Sheet. Retrieved June 17, 2025, from <https://www.himedialabs.com/TD/M770.pdf>
- Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int*
- 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, 365s-373s.
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*. Blackwell Publishing.

## J

- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E. & Mercenier, A. 2010. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 175-181.

## K

- kandler O et weiss N., 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria: Inbergey's manual of systematic bacteriology. Vol.2.(P.H.A. Sneath., Mair, N., Scharpe,M. E., Holt. M.E.,éd.,). Williams.& Wilkins,Baltimore,pp.1208-1260.
- Kang, K.H., Shin, H.J., Park, Y.H .and Lee, T.S. (1989). Studies on the antibacterial substances produced by lactic acid bacteria: purification and some properties of antibacterial substance RBifilongr produced by B. longum. *Korean Dairy Sci* 1: 204-216
- Kassas, Z. (2017). Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. These de Doctorat En Microbiologie. Universite Badji Mokhtar à Annaba.
- Kelly W.J., Davey G.P., Ward L.J. 1998. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 45: 85-92.

- Khalisani, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. International Journal of Biosciences (IJB), 1, 1-13.
- Kim, D. H., Lee, H. J., Park, C. H., & Kim, J. H. (2024). N-lactoyl amino acids: Emerging microbial metabolites with metabolic regulatory functions. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1283021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1283021>
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J. & Gasson, M. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. et Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41: 103-125.
- König, H. et J Fröhlich. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. *Lactobacillus pentosus B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin.* » *Probiotics Antimicrob Proteins*. 6: 95-104.

## L

- Lechardeur, D. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 22: 143-9.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Principes de biochimie* (6e éd.). De Boeck Supérieur.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., et al. (2000). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2021). Amino acid metabolism in lactic acid bacteria: an updated view. *Microbial Cell Factories*, 20, Article 133.
- Liang et al. (2023) – "Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction"
- Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2012). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 448-467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500245>
- Lister, J. (1877). On the lactic fermentation and its bearings on pathology. *The Lancet*, December 22, 1877.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A. & Siezen, R. J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, 11, 36.
- Liu, Y., Rousseaux, S., & Schmitt, P. (2014). Bioactive peptides in fermented dairy products: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), 577-585.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Pateiro, M., & Barba, F. J. (2017). Biogenic amines in fermented foods: Role of starter cultures. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 12-23.

- Loubière, P., Cocaing-Bousquet, M., Garmyn, D., Gaudu, P., & Lindley, N. D. (2020). Effect of growth conditions on the metabolic behavior of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 85, 103288. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103288>

## M

- MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Shiri, S., et al. (2024). A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects. *Heliyon*, 10(2), e24501.
- Mack, G. (2009). Using FADN data to develop the agent-based model SWISSland. In J.A. Boone & J.L. Teeuwen (Eds.), PACIOLI 17. Innovation in the management and use of Micro Economic Data (Report No. 2009-085). Tänikon, Switzerland: Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART. Publication ID: 21438
- Makhloufi K.M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, Thèse : Microbiologie .Biochimie, Ecole doctorale iViv, Université Pierre et Marie Curie, France, p 05-07, 18 , 20, 79.
- MAMI A. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires an Algérie. Thèse de doctorat science de la nature et de la vie. . Oran: Université d'Oran, p 17.
- Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135
- Marshall V.M.E., Law B.A. 1984. The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. P. 153-186. In: De Davies F.L., Law B.A. (ed) advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented Milk. Elsevier Applied Sciences Publishers.
- McLeod, A., Nyquist, O.L., Snipen, L., Naterstad, K .and Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol* 31 : 393-403.
- Mechai A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Algérie, p 05, 12, 13, 92-95.
- Metchnikoff, E. (1907). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. New York: G.P. Putnam's Sons.
- MicrobeOnline. (s. d.). Phenylalanine deaminase test: Principle, procedure, results, uses. <https://microbeonline.com/phenylalanine-deaminase-test->

[principle-procedure-results-uses/](#)

- Millette, M., Luquet, F.-M., Ruiz, M. T. & Lacroix, M. 2008. Characterization of probiotic properties of Lactobacillus strains. *Dairy Science and Technology*, 88, 695-705.
- Moeller, V. (1955). Simplified tests for some amino acid-decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 36, 158–172.
- MONTEL M. C., BERANGER C., BONNEMAIRE J., 2005. Les fermentations au service des produits de terroir. INRA, Paris. pp : 312.
- Mozzi f., raya r. r., vignolo g. m., 2010. biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. blackwell publishing, singapore. pp:392.
- Murray, P. R. (1978). Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) system to increase accuracy and reproducibility of the test for biotype characterization of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 46–49.

**N**

- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6th ed.). W.H. Freeman.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th

**O**

- ORLA-JENSEN S., 1919. The lactic acid bacteria in biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Konig H. ET Frohlich J. (2009) Springer Ed, allemagne, p3- 29. GARRY P, L. (1999). Les Bactéries Lactiques l'encyclopédie des charcuteries, Bull. Liaison CTSCCV Vol. 9, N°6

**P**

- P Loubière, L Novak, M Cocaign-Bousquet, Nd Lindley. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques: interactions entre flux de carbone et d'azote. *Le Lait*, 1996, 76 (1\_2), pp.5-12. fffal-00929471ff
- Pessione, A. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.

**R**

- Ranjbar, R., Salehi, M., & Hosseinzadeh, S. (2021). Thiol detection and oxidative stress: Current methods and future trends. *Analytical Biochemistry*, 613, 113954. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113954>

- Rokka, S. & Rantamäki, P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. European Food Research and Technology, 231, 1-12.
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352.

## S

- Sarantinopoulos, P., Andriguetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., ... & Tsakalidou, E. (2002). Biochemical properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 161–172.
- Savijoki, H., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2021). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Microorganisms*, 9(5), 1046.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71, 394-406.
- Salle, A. J. (1971). *Fundamental Principles of Bacteriology* (7th ed.). McGraw-Hill.
- Shiri et al. (2024) — A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects, *Heliyon*, vol. 10(2), e24501.
- Singh, T., Drake, M. & Cadwallader, K. 2003. Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2, 166-189.
- Smit, B. A., Smit, G., & Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591–610.
- Smit, G., Smit, B. A. & Engels, W. J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29, 591-610.
- Smyth, D. G., et al. (1964). "Spectrophotometric determination of thiol groups with Ellman's reagent." *Analytical Biochemistry*.
- Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36, 1-29.
- Stryer, L. (2002). *Biochimie* (5e éd.). De Boeck Université.
- Syukur, S., Bisping, B., Noli, Z. A. & Purwati, E. 2013. Antimicrobial properties and Lactase activities from selected probiotic *Lactobacillus brevis* associated with green cacao fermentation in West Sumatra, Indonesia. *J Probiotics Health*, 1.

## T

- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). *Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages*. *Applied Microbiology*, 29(6), 807–813.

- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons: état normal et pathologique. Paris: G. Carré et C. Naud.

## V

- van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., ... & Trefz, F. K. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12, 162.
- Vescovo M., Torriani S. & Orsi C. (1996). Application of antimicrobial producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready- to- use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 113–118
- Voet, D., & Voet, J. G. (2016). *Biochemistry* (5th ed.). Wiley.

## W

- Wang, J., et al. (2024). Mechanisms and factors influencing the ability of lactic acid bacteria on reducing biogenic amines in fermented food: A mini review. *LWT*, 197, 115890. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115890>
- Watford, M. (2003). Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 2887S–2890S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.2887S>
- Wisselink H.W., Weusthuis R. A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobbee G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria. A review. *International Diary J*, vol.12, p. 151-161.

## Y

- Yao, W., Yang, L., Shao, Z., Xie, L., & Chen, L. (2020). Identification of salt tolerance-related genes of *Lactobacillus plantarum* D31 and T9 strains by genomic analysis. *Annals of Microbiology*, 70, 10
- Yvon, M. & Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.
- Yvon, M. 2006. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian journal of dairy technology*, 61, 88. -Smit, G., Smit, B. A. & Engels, W. J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29, 591-610.

## Z

- Zhang, X., Li, Y., & Chen, J. (2018). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*: Thermal inactivation kinetics and protective mechanisms in MRS medium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01234>
- Zhang, Y. et al. (2022). Recent advances in microbial production of high-value chemical phenyllactic acid. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(3), 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.07.007>
- Ziehl–Neelsen, 2008 ; Cappuccino & Sherman, 2014 ; Loubière et al., 2020 Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2006). The sulfur-containing amino acids: An overview. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1636S–1640S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1636S>

## Annexes

## Annexes

### Annexe 1 : Composition des milieux d'isolement

#### - Milieu MRS (Bouillon et gélose) (Man, Rogosa & Sharpe, 1960)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Acétate de sodium.....	5g
Phosphate dipotassique.....	2g
Citrate d'ammonium.....	2 g
Sulfate de magnésium, 7H2O.....	2 g
Sulfate de manganèse, 4H2O.....	0.05 g
Glucose.....	20 g
Tween 80.....	1ml
Agar (dans le cas de la gélose) .....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Ph 6,8

Autoclavage 20 min à 120 °C

#### - Milieu M17 (Bouillon et gélose) (Terzaghi B. E & Sandine W. E (1975))

Tryptone.....	2,5 g
Peptone pepsique de viande .....	2,5 g
Peptone papaïnique de soja .....	5 g
Extrait autolytique de levure .....	2,5 g
Extrait de viande .....	5 g
Lactose .....	5 g
Glycérophosphate de sodium .....	19 g
Sulfate de magnésium .....	0,25 g
Acide ascorbique .....	0,5g
Agar agar bactériologique (dans le cas de la gélose).....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7,1

Autoclavage 20 min à 120 °C

### Annexe 2 : Composition des milieux utilisés pour l'identification

#### - Milieu Mannitol-mobilité

Peptone tripsique de viande.....	10 g/l
Mannitol.....	7.5 g/l
Nitrate de potassium.....	1 g/l
Rouge de phénol.....	0.04 g/l
Agar .....	4 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH7.6

Autoclavage à 120°C pendant 20 mn

#### - Milieu T.S.I (tripl sugar iron )( Difco & BBL Manual 2020 )

Peptone.....	20 g
Agar.....	12 g
Lactose.....	10 g
Saccharose .....	10 g

NaCl.....	5 g
Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Glucose.....	1 g
Citrate ferrique.....	0.3 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	0.3 g
Rouge de phénol.....	0.025 g

pH 7.4

Autoclavage à 120°C pendant 20mn.

**- Bouillon hypersalé (Leveau et al ; 1991)**

Glucose .....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
Peptone .....	15 g
NaCl .....	40 / 65 g
Eau distillée .....	1000ml

Autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

**- Milieu Clark et Lubs (Clark, W. M. & Lubs, H. A. (1915))**

Peptone .....	7 g
Phosphate dipotassique .....	5 g
Glucose .....	5 g
Eau distillée .....	1000 ml

Ph7

Autoclavage 20 mn à 120°C.

**- Milieu de Moëller à l'arginine (Moeller, V. G. (1955))**

Peptone .....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
Glucose .....	0.5 g
Pyridoxal .....	5 mg
Pourpre de bromocresol .....	0.1 g
Rouge de crésol .....	5 mg
Arginine .....	10 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH 6.8

Autoclavage à 120°C pendant 15 à 20 mn

**-Milieu gélose phénylalanine (Pierre-Yves Guillaume 2023 )**

L-phénylalanine.....	1
Extrait de levure .....	3
Chlorure de sodium.....	5
Phosphate dipotassique .....	1
Gélose .....	12

pH 7,3

Autoclavage à 120°C pendant 15 à 20 mn

**Annexe 3 : Colorants de la coloration de Gram**

**- Fushine (Ziehl–Neelsen (2008))**

Fushine basique .....	1g
Alcool éthylique a 90% .....	10ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100ml

**- Lugol**

Iode.....	1g
Iodure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	300ml

**- Violet de gentiane (Cappuccino J.G., Sherman N. (2014))**

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol a 90%.....	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

**Annexe 4: Composition des milieux utilisés pour la fermentation des acides aminés****Milieu M17 modifié (Bouillon)**

Extrait de levure.....	5g
Glucose .....	5g
Acide ascorbique.....	0.01g
Acide aminée (phénylalanine, tyrosine et cystéine).....	1g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Phosphate dipotassique.....	2g
Tween 80 .....	0.5ml
Eau distillée .....	1L

**Milieu Minimum (P Loubière, L Novak, M Cocaign-Bousquet, Nd Lindley. 2020)**

Glucose .....	10g
K2HP04 .....	7,5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Phénylalanine .....	0,28g ou Tyrosine..... 0,29 ou Cystéine .....
Acide ascorbique.....	0,001g

**Annexe 5 : Objectif de coloration de GRAM**

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries en deux grands groupes selon la composition de leur paroi cellulaire :

- Gram positif : paroi épaisse en peptidoglycane, retient le violet de gentiane, apparaît en violet/bleu.
- Gram négatif : paroi plus fine, perd le violet après décoloration, prend la contre-coloration rose/rouge.

## **Mise en évidence de la dégradation de quelques acides aminés par des bactéries lactiques isolées à partir du yaourt et du lben, fromage**

### **Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie moléculaire des microorganismes**

#### **Résumé**

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de certaines bactéries lactiques (BL), isolées à partir de produits laitiers fermentés (yaourt, lben, fromage), à dégrader enzymatiquement trois acides aminés : la phénylalanine, la tyrosine et la cystéine. Cette démarche vise à identifier des souches présentant un potentiel d'application dans la bioconversion de ces composés, dans le but d'améliorer les propriétés sensorielles des produits fermentés et de contribuer à la gestion de certains troubles métaboliques. Quatre souches de BL (S1, S4, S5 et S12) ont été isolées, identifiées et caractérisées sur les plans morphologique, physiologique et biochimique. Des tests enzymatiques ont permis d'évaluer leur aptitude à métaboliser les acides aminés ciblés. Les résultats ont montré que S1 appartient au genre *Lactococcus*, S4 à *Pediococcus*, S5 à *Enterococcus*, et S12 à *Enterococcus faecium*. L'analyse des profils enzymatiques a révélé une activité marquée de la souche S5 sur la phénylalanine, une capacité spécifique de S4 à métaboliser la tyrosine, une activité modérée de S1 sur la cystéine, et une double activité de S12, élevée sur la phénylalanine et plus faible sur la cystéine. Ces résultats soulignent le potentiel technologique et probiotique de ces souches, et leur intérêt pour des applications en bioconversion et en nutrition fonctionnelle.

**Mots-clés :** bactéries lactiques, acides aminés, bioconversion, troubles métaboliques.

**Laboratoires de recherche : laboratoires de microbiologie et de biovégétale de faculté des sciences de la nature et de la vie (U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Président : Bouzraib.L** (MAA – UFM Constantine 1).

**Encadrant : Zermane.F** (MAA - UFM Constantine 1).

**Examinateur : Mergoud.L** (MAA - UFM Constantine 1).