MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctoratès Sciences
Spécialité :Sciences Biologiques
Option : Microbiologie

THEME

Etude d'une bactériocine (type nisine) produite par deux souches de bactéries lactiques *(Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) isolées à partir des laits camelin et caprin et essai d'application dans la bioconservation des viandes

Présentée par : MmeSIBOUKEUR Amina

Soutenue publiquement le 18 /02/2018

Devant le jury :

Président	**Mr ADAMOU A.**	**Pr . (U.K.M.Ouargla)**
Directrice de thèse	**MmeSIBOUKEUR O.**	**Pr . (U.K.M.Ouargla)**
Examinateurs :	**Mr BOURAS N.**	**Pr. (Univ.de Ghardaia)**
	Mme. BOUDJENAH-HAROUN S.	**MCA (U.K.M.Ouargla)**
	Mme BECILA- HIOUAL S.	**MCA (I .N.A.T.A.A. Univ. de Constantine)**
	Mme AISSAOUI-ZITOUN O .	**MCA (I .N.A.T.A.A. Univ. de Constantine)**

Année Universitaire 2017-2018

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je remercie ALLAH, le tout Puissant de m'avoir aidée à le réaliser.

Il m'est agréable aujourd'hui de remercier, vivement, Mme SIBOUKEUR Oumelkheir, Professeure au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir proposé et dirigé cetravail. Je lui atteste ma gratitude pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, sesorientations et sa patience.

Je tiens à exprimer mes respectueux et sincères remerciements à Monsieur ADAMOU Abdelkadder Professeur, Faculté des Sciences de laNature et de la Vie, Université Kasdi MerbahOuargla pour avoir accepter de présider cette soutenance.

A Mesdames,BOUDJENAH-HAROUN Saliha, Maître de Conférences A, duDépartement des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla, BECILA – HIOUAL Samira et AISSAOUI-ZITOUN Ouarda, Maîtres de Conférences A àl'INATAA ,Université de Constantine et à Monsieur BOURAS Noureddine Professeur à l'Université de Ghardaïa, j'adresse ma profonde gratitude pour l'honneur qu'ils ont bien voulu me faire en acceptant de porter un jugement à cette thèse.

Je ne saurai oublier Monsieur SIBOUKEUR Abdallah, doctorant à l'université Kasdi Merbah Ouargla pour l'étude statistique et Monsieur le Professeur MOUSSA-BOUDJEMAA Boumediene, Directeur du « Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement » LAMAABE), de l'université de Tlemcen pour nous avoir fourni les souches sélectionnées utilisées dans ce travail.

Que Monsieur BEGGARI El-Aich et tout le personnel des laboratoires pédagogiques trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour leur précieuse aide.

Enfin, que tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation dece modeste travail, soient assurés de ma profonde gratitude.

Dédicace

Je dédie cette thèse ;

A la mémoire de mon très cher fils Zayd qui a apporté beaucoup de joie à notre vie depuis sa naissance jusqu'à son décès ;

à mes très chers parents, à mon très cher époux Zoubir, à mon adorable frère Abdallah .Je les remercie tous pour m'avoir encouragée et aidée afin que je puisse terminer ce travail

à mon adorable fille Chayma, que Dieu le Tout Puissant, la protège pour moi ;

À mes beaux parents ;

Au reste de ma famille ;

À mes amies.

Table des matières

Remerciements....2
Dédicace....3
Liste des abréviations....9
Liste des figures....11
Liste des tableaux....14
Liste des photos....15
Résumé....16
Abstract....18
Introduction....1
1.1. Lait camelin....5
1.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques....5
1.1.2 . Microbiologie du lait camelin....7
1.1.2.1. Protéines lactosériques et effets antibactériens....10
1.1.2.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques....12
1.2. Lait caprin....12
1.2.1. Caractérisation physico-chimique et biochimique....12
1.2.2. Microbiologie du lait caprin....14
1.2.2.1. Protéines lactosériques et effets antibactériens....17
1.2.2.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques....17
1.3. Bactéries lactiques....18
1.3.1 Généralités....18
1.3.2. Activité antimicrobienne....19
1.3.2.1Acides organiques....19
1.3.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)....19
1.3.2.3 Bactériocines....20
1.3.2.3.1 Définition....20
1.3.2.3.2 Caractéristiques générales....20
1.3.2.3.3. Classification....21
1.3.2.3.4. Mécanisme de production des bactériocines et sa régulation....23
1.3. 2.3.5 .Applications des bactériocines dans l'industrie Agro-alimentaire :....24

1.3. 2.3.6. Utilisation des souches productrices de bactériocine dans les IAA.....25
1.3. 2.3.7.Utilisation de bactériocines combinées avec d'autres agents de conservation.....26
1.3. 2.3.8. La nisine.....26
1.3. 2.3.9. Souche productrice de nisine : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 29
II .Matériel et méthodes.....35
2.1. Matériel biologique.....35
Nous avons utilisé dans cette étude trois et cinq échantillons de lait de mélange en provenance de chacune des deux espèces cameline et caprine respectivement.....35
2.1.1. Lait de chamelle.....35
2.1.2. Lait de chèvre.....35
2.1.5. Souches bactériennes.....35
2.1.6. Appareillage.....36
2.1.7. Réactifs.....36
- Eau physiologique.....36
2.2. Méthodes analytiques.....37
2.2.1. Tests préliminaires.....37
2.2.2. pH.....37
2.2.3. Acidité Dornic.....37
2.2.4. Test de la réductase.....37
2.2.5. Isolement des souches de lactocoques.....38
2.2. 5.1.Préparation des dilutions.....38
2.2. 5.2.Ensemencement sur gélose M17.....38
2.2. 5.3 Examen des colonies développées.....38
Figure 2 : Procédure expérimentale de pré- identification des souches isolées.....39
2.2. 5.4. Examen macroscopique.....40
2.2. 5.5.Examen microscopique.....41
2.2. 5.6.Caractérisation physico-chimique et biochimique des souches isolées.....41
2.2. 5.7.Purification des souches.....41
2.2. 5.8.Optimisation des conditions de culture des souches d'intérêt, isolées.....41
2.2..5.8.1. Réalisation des courbes de croissance.....42
2.2.5.8.2. Mesure de la croissance.....42
2.2.5.8.3 Essais d'optimisation des conditions de culture.....44
2.2. 5.9 .Production de la bactériocine par les souches isolées.....46

2.2. 5.9.1. Préparation des pré-cultures....46
2.2. 5.9 .2. Séparation de la biomasse et récupération des surnageants....46
2.2. 5.10 .Essais d'optimisation des conditions de conservation de la souche d'intérêt....49
2.2. 5. 10.1. Préparation et conservation des cultures....49
2.2. 5 10.2.Réalisation de la courbe d'étalonnage et détermination des concentrations cellulaires....50
2.2. 5.10. 3. Inoculation des tubes de conservation....50
2.2. 5.10.4. Mesure de la concentration cellulaire des cultures de Lc. après conservation....50
2.2. 5.11 Utilisation des souches d'intérêt isolées dans la bioconservation des viandes....51
2.2. 5.11.1. Origine de la viande....51
2.2. 5.11.2.Analyses microbiologiques de la viande....51
2.2. 5.12. Essais de bioconservation des viandes....53
2.2. 5.12. 1. Constitution des lots de viande destinés à la bioconservation....53
2.2. 5.12. 2. Recherche et dénombrement des souches de *Staphylococcus aureus* durant la réfrigération des lots expérimentaux de viande....55
2.2. 5.13. Analyses statistiques....56
III-Résultats et discussion....58
3.1. Tests préliminaires....58
3.2. Isolement des lactocoques sur milieu M17....59
3.3. Examen macroscopique....59
3.4. Examen microscopique....61
3.4.1. Examen à l'état frais....61
3.4.2. Examen après coloration de GRAM....61
3.4.3. Caractérisation physico-chimique et biochimique des cellules....62
3.5. Optimisation des conditions de culture des souches cameline et caprine isolées....64
3.5.1. Souche de lactocoques camelins....64
3.5.1. 1.Culture de la souche sur milieu M17 et courbe de croissance....64
3.5.1.2. Culture de la souche sur milieu MRS et courbe de croissance....65
3.5.2. Souche de lactocoques caprins....67
3.5.2. 1.Culture de la souche sur milieu M17 et courbe de croissance....67
3.5.2.2. Culture de la souche sur milieu MRS et courbe de croissance....68
3.6. Essais d'optimisation des conditions de culture des deux souches d'intérêt isolées....69
3.6.1. Essais d'optimisation des conditions de culture des souches isolées....69

3.6.1.1. Culture de la souche cameline sur M17 70
3.6.1.2. Culture de la souche cameline sur MRS 71
3.6.2. Essais d'optimisation des conditions de culture de la souche caprine 73
3.6.2.1. Culture de la souche caprine sur M17 73
3.6.2.2. Culture de la souche caprine sur MRS 74
3.6.3. Etude statistique de l'optimisation des conditions de culture des souches 75
3.7. Production de bactériocine 77
3.7.1. Préparation des pré-cultures 77
3.7.2. Séparation de la biomasse et récupération des surnageants 77
3.7.3. Mesure du pH des surnageants 77
3.7.4. Tests d'antagonisme 78
3.7.4.1 Méthode des puits 78
3.7.4.2 Méthode des spots 79
3.7.4.3 Méthode des disques 79
3.7.5. Nature chimique de la substance antibactérienne contenue dans les surnageants 80
3.7.5.1. Effet de température 82
3.7.5.2. Effet du pH 82
3.7.5.3. Sensibilité de la substance aux protéases 83
3.8 .Optimisation des conditions de conservation des souches bactériocinogènes 83
3.8.1 .Optimisation des conditions de conservation des souches camelines 84
3.8.1.1. Courbe étalon 84
3 .8.1.2. Réfrigération 85
3.8.1.3 Congélation sans cryoprotecteur 86
3.8.1.4 Congélation avec le saccharose (12%) 86
3.8.1.5. Congélation en présence de DMSO (5%) 87
3.8.1.6. Congélation en présence de glycerol (15%) 88
3.8.1.7.Taux de survie des souches camelines 89
3.8.2 .Optimisation des conditions de conservation des souches caprines 89
3.8.2.1. Courbe étalon 89
3 .8.2.2. Réfrigération 90
3.8.2.3 Congélation sans cryoprotecteur 91
3.8.2.4 Congélation en présence de saccharose (12%) 92
3.8.2.5. Congélation en présence de DMSO (5%) 92

3.8.2.6. Congélation en présence de glycerol (15%) 93
3.8.2.7.Calcul du taux de survie des souches caprines 94
3.8.3. Etude statistique 94
3.9. Essais de bioconservation des viandes cameline et de poulet : Utilisation des souches bactériocinogènes isolées à partir des laits camelin et caprin 96
3.9.1. Analyses préliminaires des viandes 97
3.9.1.1. Mesure du pH 97
3.9.1.2. Analyse microbiologique de viandes 97
3.9.1.2 .1.Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) 98
3.9.1.2 .Dénombrement des *Staphylococcus aureus* 99
3.9.2. Essais de bioconservation des produits carnés 101
3.9.2.1-Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* durant l'entreposage de la viande cameline à 4^0C pendant sept jours 101
3.9.2.1.1. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C 101
3.9.2.1.2. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C 103
3.9.2.1.3.Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline surcontaminée par une souche sélectionnée *St.aureus*ATCC 11778 et traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C 104
3.9.2.1.4.Evolution de la souche sauvage de *St.aureus*. de la viande cameline surcontaminée par une souche sélectionnée *St.aureusATCC 11778* et traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C 105
3.9.2.1.5. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* du poulet traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C 106
3.9.2.1.6. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* du poulet traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C 107
3.9.2.1.7. Evolution des *St.aureus* du poulet surcontaminé et traité par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C 108
3.9.2.1.8. Evolution des *St.aureus* du poulet surcontaminé et traité par les Lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C 109
Conclusion 114
Références bibliographiques 118
ANNEXES 138

Liste des abréviations

3-PGA : Acide 3 - phosphoglycérique

aa : Acide Aminé

AG : Acide Gras

AGI: Acide Gras Insaturé

AGS: Acide Gras Saturé

Amy: Amygdaline

Ara : Arabinose

Asp : Aspartate

BD : Baird Parker

Cit : Citratase

Dha : dideshydro-lanthionine

DHAP : Dihydroxyacétone 3-Phosphate

Dhb : acide dideshydroaminobutyrique

DMSO: Diméthyl sulfoxyde

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

F_6P : Fructose 6 Phosphate

FBP : Fructose 1 ,6 biphosphate

FMAT: Flore mésophile aérobie totale

G_6P : Glucose 6 Phosphate

GAP : Glycéraldéhyde 3 -Phosphate

Glc : Glucose

H_2O_2: Peroxyde d'hydrogène ou Peroxyde d'oxygène ou Eau Oxygénée

His : Histidine

Ig : Immunoglobulines

Ino: Inositol

L. : Listeria

Lactose-PTS : Système Lactose- Phospho-transferase

Lan : lanthionine

Lb. : Lactobacillus

Lc. : Lactococcus

LCB : Lactocoques Bovins

LCCM : Lactocoques Camelins

LCCP : Lactocoques Caprins

LF : Lactoferrine

LP : Lactoperoxydase

LZ : Lysozyme

Man : Mannitol

Mel : Mélibiose

MRSA : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

Pc. : Pédicococcus

PEP : Acide Phospho-Enol Pyruvique

PEP- PTS : système de Phosphoenolpyruvate –Phosphotransferase

PM : Poids moléculaire

PP3 : composant-3- des Protéose- Peptones

ppm : Partie Par Million

QPS : Qualified Présumption Recognized As Safe

Rha : Rhamnose

Sac : Saccharose

SN: Surnageant

SNB : Surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* bovin

SNCM : Surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* camelin

SNCP : Surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* caprin

Sor: Sorbitol

Staph.: *Staphylococcus*

Système LPS : Système « Lactoperoxydase- Peroxyde d'hydrogène –Thiocyanate »

ufc : unité formant colonies

VB: Viande blanche

Voie EMP : Voie d'Embden –Meyerhoff- Parnas

VRC: Viande rouge cameline

Wa : Water Activity (Activité de l'Eau)

ZI : Zone d'inhibition

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes voies de transport et le métabolisme initial des sucres(mono et disaccharides) chez *Lactococcus lactis(* NEVES *et al.*, 2005) 31
Figure 2 : Procédure expérimentale de pré- identification des souches isolées 39
Figure 3 : Préparation des cultures de Lc. et réalisation des courbes de croissance 43
Figure 4 : Courbe d'étalonnage DO f(dilutions) dans le bouillon M17 65
Figure 5: Courbe de croissance d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait camelin sur milieu M17 65
Figure 6 : Courbe d'étalonnage DO en fonction de la concentration cellulaire sur milieu MRS 66
Figure 7: Courbe de croissance d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait camelin sur milieu MRS 66
Figure 8: Courbe d'étalonnage DO f(dilutions) 67
Figure 9: Courbe de croissance d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin sur milieu M17 68
Figure 10: Courbe d'étalonnage de la souche Lactocoques ensemencée dans un milieu MRS. 68
Figure 11: Courbe de croissance d'une souche de Lactocoques isolée à partir du lait caprin sur milieu MRS 69
Figure 12: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelines isolée sur milieu M17 en fonction de concentration en glucose et en fructose (A) pendant 18 h et 24 h (B)d'incubation. 70
Figure 13: Evolution du pH de la souche de Lactocoques camelins,isoléesur milieuM17à différents concentration en fructose et glucose 71
Figure 14: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques camelins, isolée sur milieu MRS en fonction de concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18 h et 24 h 72
Figure 15: Evolution du pH de lactocoques isolés sur milieu MRS à différentes concentrations en fructose et en glucose 72
Figure 16: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques isolée sur milieu M17 en fonction de la concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18h et 24h 73

Figure 17: Evolution du pH de la souche de Lactocoques isolée sur milieu M17 à différentes concentrations en fructose et glucose 74
Figure 18:Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques isolée sur milieu MRS en fonction de la concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18h et 24h.....75
Figure 19: Evolution du pH de la souche de Lactocoques à différentes concentrations en fructose et glucose pour MRS.....75
Figure 20: pH des surnageants de culture de Lc. 78
Figure 21 : Courbe d'étalonnage : DO en fonction de la concentration cellulaire de la souche de lc. camelins.....84
Figure 22 : Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée à 4 °C et du pH.....85
Figure 23: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation sans cryo-protecteur et du pH. 86
Figure 24: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de saccharose (12%)et du pH. 87
Figure 25: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de DMSO (5%) et du pH.....88
Figure 26: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de glycérol (15%) et du pH 89
Figure 27 : Courbe d'étalonnage (DO en fonction de la concentration cellulaire de la souche de lc caprines) 90
Figure 28: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée à 4 °C et du pH.....91
Figure 29: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation sans cryo-protecteur et du pH. 91
Figure 30: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de saccharose (12%)et du pH. 92
Figure 31: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de DMSO (5%) et du pH.....93
Figure 32: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de glycérol (15%) et du pH 93

Figure 33:Evolution des staphylocoques de la viande cameline traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C 102
Figure 34 : Evolution des *Staph.* de la viande cameline traitée par une culture de Lc, durant l'entreposage à 4°C 103
Figure 35 : Evolution des Staph.sur la viande cameline surcontaminée par *St. aureus* 11778 traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4^{0} C 104
Figure 36 : Evolution des Staph. sur la viande cameline surcontaminée par des *St.aureusATCC1778* traitée par une culture de Lc., durant l'entreposage à 4°C 105
Figure 37:Evolution des Staph. Sur le poulet traité par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C 106
Figure 38 : Evolution des Staph.sur le poulet traité par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4 ° C 107
Figure 39 : Evolution de la souche cible du poulet surcontaminé par des *St. aureus ATCC25923*, traité par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C.....108
Figure 40 : Evolution des Staph. sur le poulet surcontaminé par des *St. aureus ATCC25923*, traité par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4 ° C 109

Liste des tableaux

Tableau I.: Flore originelle du lait cru (VIGNOLA et al., (2002). 15
Tableau II : Test de pré-identification physico-chimique et biochimique des souches isolées 41
Tableau III: Constitution des lots expérimentaux du milieu M17, destinés à la culture de la souche d'intérêt isolée 45
Tableau IV: Constitution des lots expérimentaux du milieu MRS, destinés à la culture de la souche d'intérêt isolée 45
Tableau V: Constitution des lots expérimentaux de culture des Lc. pour la production de la bactériocines 46
Tableau VI: Constitution des lots de cultures de Lc. destinés à la conservation 50
Tableau VII: Constitution des lots expérimentaux de viandes, rouge et blanche traitées par les cultures de Lc. ou par leurs surnageants 54
Tableau VIII: Constitution des lots expérimentaux de viandes, rouge et blanche surcontaminées par *St.aureus* ATCC25923, traitées par les cultures de Lc. ou par leurs surnageants 55
Tableau IX: pH et acidité Dornic des échantillons de lait camelin 58
Tableau X: pH et acidité Dornic des échantillons de lait caprin 58
Tableau XI: Examen macroscopique des colonies isolées à partir de lait camelin 60
Tableau XII : Examen macroscopique des colonies isolées à partir de lait caprin 61
Tableau XIII: Caractéristiques physico-chimique et biochimique des souches 63
Tableau XIV: Effet de la chaleur sur l'activité antimicrobienne 82
Tableau XV : Effet du pH sur l'activité antimicrobienne 83
Tableau XVI: Dénombrement de FMAT (viande cameline) 98
Tableau XVII: Dénombrement de FMAT (poulet) 99
Tableau XVIII: Dénombrement des *St. aureus* de la viande cameline 100
Tableau XIX: Dénombrement des *St. aureus du* poulet 100

Résumé

Etude d'une bactériocine (type nisine) produite par deux souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) isolées à partir du lait des espèces, cameline et caprine : utilisation dans la bioconservation des viandes

La présente étude comporte cinq volets d'investigation complémentaires : - isolement d'une souche d'intérêt " *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*" à partir du lait de deux espèces laitières, cameline et caprine ; - optimisation de ses conditions de culture par modification du milieu de culture , de sa composition (addition de fructose ou de glucose à différentes proportions) et de la durée d'incubation ;- production de bactériocine (de type nisine) et étude de son activité antibactérienne à l'égard d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, par des tests d'antagonisme (puits, spots et disques) ; -optimisation des conditions de conservation des souches d'intérêt isolées, par réfrigération et par congélation sans et avec cryoprotecteurs (saccharose, glycérol et DMSO) ; -essais de bio-conservation des viandes, cameline et de poulet par la bactériocine contenue dans les surnageants de culture des souches lactococciques cameline, caprineet bovine (témoin).L'action *in situ* des bactériocines est parallèlement étudiée par inoculation des produits carnés par les cultures de lactocoques camelins, caprins et bovins.

Après isolement sur M17,les souches ont été purifiées par 5 repiquages successifs et identifiées par des tests physico-chimiques et biochimiques. Les essais d'optimisation des conditions de culture ont montré que le M17 avec une période d'incubation égale à 24 heures convenait mieux aux souches camelines et permettent l'obtention d'une meilleure biomasse et ce quelque soit l'ose ajouté au milieu et ses proportions. Pour les souches caprines, c'est plutôt le milieu MRS qui a permis l'obtention d'une meilleure biomasse et ce quelque soit la nature de l'ose (fruc. glc.) ajouté au milieu et ses proportions et quelque soit la durée d'incubation utilisée.

Les tests d'antagonisme réalisés avec les surnageants de culture des lactocoques camelin (SNCM) , (SNCP) et bovin (SNB) par la méthode des disques ont donné des zones d'inhibition (ZI) comparables pour le SNCP et le SNCM. Des zones d'inhibition plus petites ont été obtenues avec le surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bovin (SNB). La bactériocine contenue dans tous les surnageants est thermostable, résistante à des pH acides et basiques et à la pepsine, ce qui nous a permis de confirmer qu'il s'agit bien d'une bactériocine (type nisine).

Par ailleurs, les essais d'optimisation des conditions de conservation par congélation des souches de lactocoques ont montré que l'utilisation du DMSO, celle du glycérol, ou du saccharose comme cryoprotecteur n'améliorait pas significativement la conservation des souches camelines($p>0.05$). La congélation (-20°C) sans cryoprotecteurs suffirait pour conserver les souches camelines durant vingt jours. La conservation des souches caprines est par contre meilleure par congélation en présence de saccharose à 12%.

Les analyses préliminaires des viandes, cameline et de poulet ont montré des taux de germes supérieurs aux normes réglementaires, notamment ceux des *Staphylococcus aureus,* espèce contaminante et altérante des viandes aussi bien rouge que blanches. Dans cette partie de l'étude, les surnageants de culture (les bactériocines) et les souches de lactocoques (production de bactériocines *in sit*u) sont utilisées dans un but de bioconservation de la viande de dromadaires et le poulet, deux produits carnés entrant dans les habitudes alimentaires de la population locale. Nous remarquons que les surnageants et les Lc. présentent une activité inhibitrice presque similaire. Ce résultat est de nature à suggérer que la part de la bactériocine produite par l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dans le système de défense contre les staphylocoques est importante. Concernant la conservation de la viande cameline, l'activité anti- staphylococcique exercée par la bactériocine contenue dans le surnageant caprin ou par les souches de Lc. caprins (production de bactériocine *in situ*) semble plus importance que celle exercée par les souches de Lc. camelines et leur surnageant. Concernant, la viande de poulet, des constatations similaires à celles relevées dans le cas de la viande rouge ont été enregistrées. D'une manière générale, une augmentation du taux de Staph. est observée durant les deux premiers jours (J0+1) de conservation des produits carnés expérimentaux. Cette augmentation est plus prononcée dans le cas des produits carnés surcontaminés par la souche de *Staphylococcus aureus*ATCC25923, traités par les Lc. ou par leur surnageants. Le phénomène de rebond a été observé au-delà du 3ème jour (J0+2) de conservation dans la majorité des cas. Cela nous conduit à préconiser une limite de la durée de réfrigération des denrées carnées traitées directement ou indirectement par la bactériocine (type nisine).

Mots clés : lait, dromadaire, chèvre, *Lactococcus lactis* subsp.*lactis,*bactériocine, *Staphylococcus aureus*, optimisation, viandes, bioconservation.

Liste des photos

Photo 1 : Colonies de lactocoques isolées à partir du lait camelin, sur milieu M17 60
Photo 2: Colonies de lactocoques isolées à partir du lait caprin, sur milieu M17 60
Photo 3 : Souche de lactocoques isolée à partir du lait camelin après coloration de GRAM. (Grossissement 1000) 62
Photo 4: Souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin après coloration de GRAM. (Grossissement 1000) 62
Photo 5: Test d'antagonisme des surnageants de culture de Lc à l'égard de *St.aureus*. : Test des puits (cas des SNCM).....79
Photo 6 : Test d'antagonisme des SNCM à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923..81
Photo 7 : Test d'antagonisme des SNCP à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923...81
Photo 8 : Test d'antagonisme des SNB à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923 81
Photo 9: Développement de la FMAT de la viande cameline sur milieu PCA 98
Photo 10: Colonies de *St. aureus* sur milieu BP 100

Abstract

Study of a bacteriocin (nisin type) produced by two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from camel and goat milk and application test in meat bioconservation

The present study has five complementary aspects of investigation namely: isolation of required strain "*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*" from the milk of two dairy species (camelina and goat); the optimization of its culture conditions by the modification of the growing environment, of its composition (addition of fructose or glucose with different dosage) and of the time of the incubation; the production of bacteriocin (nisin type) and the study of its antibacterial activity against a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) strain by antagonism tests (wells, spots and discs); the optimization of the conserved conditions of isolated strains by refrigeration, freezing with and without cryoprotectants (sucrose, glycerol and DMSO); the bio-preservation tests of camel and chicken meats by contained bacteriocin in the supernatants culture of camel, goat and bovine strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (control sample); and the field action of bacteriocins is studied along with the inoculation of meat products of camelins, goats and cattle lactococci cultures.

After isolation on M17, the strains were purified by 5 successive subculturesandidentifiedby physicochemical and biochemical tests. The trials of optimization of the growing conditions showed that the M17 with an incubation period equal to 24 hours was better suited to the camel strains and allow obtaining a better biomass whatever the added ose to the environment and its proportions. For the goat strains, it is rather the MRS environment that has made it possible obtaining a better biomass whatever the nature of the ose (fruc., Glc.) added to the environment and its proportions or the incubation time used.

The antagonism tests carried out with the supernatants culture of camel (SNCM), (SNCP) and bovine (SNB) lactococcal by the disk method which gave comparable zones of inhibition (ZI) for the SNCP and the SNCM). Smaller zones of inhibition were obtained with the supernatant culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bovinewhich is genetically identified (SNB). The contained bacteriocin in all the supernatants is thermostable and resistant at acidic and basic pH and with pepsin, which allowed us to confirm that it is a bacteriocin (nisin type).

Moreover, the optimization tests of frozen storage conditions of lactococci strains showed that the use of DMSO, glycerol, or sucrose as a cryoprotectant did not significantly improve the

conservation of camel strains ($p>0.05$). Freezing (-20 ° C) without cryoprotectants would be enough to keep the camel strings for twenty days. On the other hand, the conservation of goat strains is better by freezing in the presence of 12% sucrose.

Preliminary analyzes of camel and chicken meats have shown rates of germs higher than the normal levels, including *Staphylococcus aureus*, and contaminating species of red as well as white meat. In the present part, the supernatants culture (bacteriocins) and Lactococcus strains (on-site production of bacteriocin) are used for the sake of bioconservation of camel and chicken meat products which are both returning in the eating habits of the local population. Concerning the conservation of camel meat, we notice that supernatants and Lc. show nearly a similar inhibitory activity. This result suggests that the part of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* species as defense system against staphylococci is important. Concerning the preservation of camel meat, the anti-staphylococcal activity exercised by the bacteriocin contained in the goat supernatant or by the goats' Lc. strains (on-site production of bacteriocin) seems more important than that exercised by camelines Lc.strains and their supernatant. Regarding chicken meat, similar findings to those found in the case of red meat were recorded. Generally speaking, an increase in Staph. rate is observed during the two first days (J0 + 1) of experimental preservation of meat products. This increase is more pronounced in the case of meat products which are over contaminated with the *Staphylococcus aureus*ATCC25923 strain and treated with Lc. or by their supernatants. The rebound phenomenon was observed beyond the 3rd day (J0 + 2) of conservation in the majority of cases. This leads us to recommend a limit of the refrigeration time of meat products treated directly or indirectly by bacteriocin (nisin type).

Key words: milk, camel, goat, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, bacteriocin,*Staphylococcus aureus*, optimizations, meat, bioconservation.

ملخص

دراسة لبكتريوسين (نوع نيسين) المنتجة من طرف سلالتين من البكتيريا اللاكتيكية *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*معزولة من حليب الإبل والماعزواختبارها فيمجالفيالحفظ البيولوجيللحوم

تهتم هذه الدراسة بخمسة جوانب تكميلية من التحقيق: - عزل سلالة ذات فائدة "*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* من حليب ، الناقة والماعز - تحسين ظروف زرعهما عن طريق تعديل الوسط المعيشي، تكوينه (إضافة الفركتوز أو الجلوكوز بنسب مختلفة) ووقت الحضانة؛ -إنتاج بكتيريوسين (نوع نيسين) ودراسة نشاطها المضاد ضد سلالة من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus ATCC 25923*، عن طريق اختبارات العداء (الآبار والبقع والأقراص).- تحسين ظروف حفظ هتين السلالتين ، عن طريق التبريد أو التجميد مع اوبدون مواد حافظة(السكروز، الجلسرول وDMSO)؛-محاولة حفظلحوم (الجمال والدجاج)عن طريق استعمال البكتريوسين الموجؤدة في المواد المواد الطافيةsurnageantsزرع بكتيريا*Lactococcus الابل، المعز والبقر(مستعملة كشاهد)*.

بعد العزل داخل وسطM17 ، تم تنقيةاالسلالات المعزولة عن طريق 5 زراعات تنقية متتالية تم والتعرف على البكتيريا عن طريق الاختبارات الفيزيائية والكيمياء الحيوية.

أظهرت تجارب تحسين ظروف زرع أن M17 مع فترة حضانة 24 ساعة كان أكثر ملائمة للسلالات المعزولة من حليب الإبل حيث يسمح هذا الوسط بالحصول على كتلة حيوية أفضل مهما كان تركيز السكريات المضافة إليه. بالنسبة لسلالات المعزولة من حليب الماعز فإن الوسط MRS مكننا من الحصول على أفضل كتلة حيوية مهما كانت طبيعة و نسبة السكريات المضافة إليه. ومهما كان وقت الحضن المستخدم.

أعطت اختبارات العداء التي أجريت علىالمواد الطافية ل*Lactococcus* المعزولة من حليب النوق و المعز مناطق تثبيط ZI متقاربة أما المعزولة من حليب البقر والماخودة كشاهد مناطق تثبيط أصغر.

إن البكتريوسينات الموجودة في جميع المواد الطافيةsurnageantsمقاومة للحرارة ومقاومة للحموضة والبيبسين، مما سمح لنا بالتأكد من انها بكتيريوسين (نوع نيسين).

إضافة إلى ذلك، اختبارات تحسين حفظ هذه البكتيريا عن طريق التجميد أظهرت أن استخدام DMSO، الجلسرول، أو السكروز كا cryoprotecteurs لم يحسن بشكل ملحوظ حفظ البكتيريا .($p>0.05$) المعزولة من حليب النوق($p>0.05$).

التجميد (-20 درجة مئوية) دون cryoprotecteurs كان كافيا للحفاظ على هذه البكتيريا لمدة عشرين يوما. من ناحية أخرى، حفظ سلالات البكتيريا المعزولة من حليب الماعزكان افضل عن طريق التجميد في وجود 12٪من السكروز.

أظهرت التحاليل الأولية للحوم والجمل والدجاج إن معدلات الجراثيم فاقت المعايير التنظيمية،، بما في ذلك المكورات العنقودية الذهبيةالملوثة للحوم الحمراء و البيضاء.

وأظهرت التحاليل الأولية للحوم الابل واالدجاج مستويات أعلى من المستويات العادية للجراثيم، بما في ذلك المكورات العنقودية الذهبية، الملوثة للحوم الحمراء والبيضاء. في هذا الجزء من الدراسة، تم استخدام المواد الطافية (البكتريوسينات) وسلالات البكتيري اللبنية (إنتاج البكتريوسين في الموقع) لغرض الحفظ البيولوجي للحوم الإبل والدجاج، اللذان ينتميان للعادات الغذائية للسكان المحليين. تظهر النتائج نشاط مثبط للبكتيريا العنقودية الذهبية متماثل تقريبا بين

المواد الطافية و السلالات المعزولة من الحليب. هذه النتيجة تشير إلى أن البكتيريا التي تنتجها *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* لها دور هام في نظام الدفاع ضد المكورات العنقودية الذهبية.فيما يتعلق بحفظ لحوم الإبل، فإن النشاط المضاد للفيروسات العنقوديةالذهبية الذي تمارسه البكتيريوسين الموجودة قي المواد الطافية للسلالات المعزولة من حليب الماعز اوالسلالات المعزولة من هذا الاخير (إنتاج البكتيريوسين في الموقع) يبدو أكثر أهمية من ذلك الذي تمارسه البكتيريوسين الموجودة قي المواد الطافية للسلالات المعزولة من حليب الإبل و السلالات المعزولة من نفس الحليب. أما بالنسبة للحم الدجاج، فقد تم تسجيل نتائج مماثلة لتلك المتحصل عليها في اللحوم الحمراء. بشكل عام، لوحظ خلال اليومين الأولين (J0 + 1) من الحفظ التجريبي للحوم زيادة في عدد المكورات العنقودية الذهبية.كما لوحظ. ان هذه الزيادة هي أكثر وضوحا في حالة اللحوم الملوثة بسلالة من المكورات العنقودية الذهبيةATCC25923، والمعالجة بالمواد الطافية للسلالات المعزولة من حليب او للسلالات المعزولة من حليب. وقد لوحظت أيضا ظاهرة انتعاش ما بعد اليوم الثالث (J0+2)من الحفظ في معظم الحالات. هذا يقودنا إلى التوصية بالحد من وقت تبريد منتجات اللحوم المعالجة بشكل مباشر أو غير مباشر بالبكتيريوسين (نوع نيسين).

الكلمات الدالة: الحليب، الابل، الماعز، *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ، *bacteriocine*، *المكورات العنقودية الذهبية* ،*تحسين* ، *اللحوم* ، *حفظ*.

Introduction

Introduction

La consommation des laits de camelin et caprin fait partie des habitudes alimentaires de la population locale qui leur attribue de nombreuses "allégations santé" parmi lesquelles l'activité anti-infectieuse. Dans ce contexte, de nombreux travaux rapportent, l'effet bactéricide dû à la présence des bactériocines notamment la nisine, produite par des souches lactiques, notamment l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis.*

Récemment, SIBOUKEUR, (2011), en isolant une souche de *Lactococcus lactis* à partir du lait camelin a montré l'effet antagoniste des surnageants de culture de celle-ci contre une souche sauvage de *Staphyloccus aureus*isolée à partir d'un échantillon de lait de chamelle. L'étude a montré également que cet effet était plus prononcé en culture mixte*: Lc. et St.*

L'effet bactéricide des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique *(Lactococcus lactis)*isolée à partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe *(Pseudomonas fluorescens)* aété également mis en évidencepar SOUID, (2011).

A la même période, BOURICHA,(2011) a sélectionné des souches de *Leuconostoc mesenteroides* productrices de substances antimicrobiennes à partir du lait camelin.

Un autre auteur, GUATARNI, (2013) a étudié l'effet antimicrobien des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus de chamelles, de chèvre,de brebis et de vache algériennes sur la croissance de *Helicobacter pylori.* En ce qui concerne, la flore lactique caprine, HANNACHI , (2008) a étudié l'inhibition de bactéries indésirables (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus cereus*ATCC11778 par l'activité antimicrobienne de neuf souches de Leuconostoc isolées à partir du lait cru de chèvre et de fromage Roquefort. RAYNAL-LJUTOVAC et *al.,* (2008) ont étudié l'inhibition naturelle de la croissance de *St. aureus* dans les fromages au lait cru de chèvre. Plus récemment, DJADOUNI, (2013), a isolé deux souches *Lactobacillus plantarum* et *Pedicoccus pentosaceus* à partir du lait caprin, présentant une forteactivité bactéricide contre *Listeria ivanovii.* Ce même auteur a caractérisé les bactériocines produites par les deux souches isolées.

Ces substances antimicrobiennes sont des peptides de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur

spectre d'action est généralement étroit. La plupart d'entre elles ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes et Staphylococcus aureus.* L'application des bactériocines ou des souches productrices dans les aliments pour y éviter le développement de bactéries pathogènes et/ ou altérantes est rapportée dans de nombreux ouvrages. Parmi ces substances d'intérêt, la nisine possède un effet bactéricide à l'égard des bactéries à GRAM positif tels que les détériorants alimentaires *(Clostridium, Bacillus...),* les pathogènes *(Listeria monocytogenes),* et celles responsables des mammites bovines *(Staphylococcus aureus et Streptococcus dygalacticae).* A cet effet, elle trouve de nombreuses applications dans les industries, agro-alimentaire (produits laitiers et produits carnés) et cosmétique (dentifrices). C'est pratiquement la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire conservateur (E234) de certains aliments lactés, de conserves et de produits carnés.

Par ailleurs, les risques de contamination des viandes lors de l'abattage, de la découpe et de la transformation sont élevés, même si beaucoup de progrès ont été faits en matière de manipulation et d'hygiène. Les viandes et les produits carnés contaminés par des bactéries pathogènes sont de ce fait, régulièrement impliqués dans des maladies d'origine alimentaire, comme en témoignent les crises qui secouent régulièrement ce secteur. Parmi les bactéries pathogènes incriminées dans les filières citées, l'espèce *Staphylococcus aureus* est redoutable du fait de sa capacité de produire des entérotoxines émétiques. Ces toxines thermorésistantes provoquent, en un court délai après l'ingestion, des vomissements intenses, des crampes abdominales et des diarrhées. DORTU et THONART, (2009) rapportent à ce sujet, que les bactéries productrices de bactériocines peuvent être appliquées directement sur les matrices alimentaires, la bactériocine est dans ce cas produite *in situ*. Dans le même ordre d'idée, parmi les différents genres bactériens pouvant exercer des actions de bioprotection, GARRY et *al.*, (2008) citent les genres lactococcus, lactobacillus et pediococcus.

Assurer la sécurité sanitaire des viandes est devenue par conséquent une préoccupation récurrente dans la filière des produits carnés: les viandesparticulièrement.

La présente étude s'inscrit dans ce contexte et vise à contribuer à la sécurité sanitaire des produits carnés entrant dans les habitudes alimentaires de la population locale, en utilisant la nisine, produite par des souches lactiques isolées à partir du lait, camelin et caprin.

Elle comporte cinq volets complémentaires d'investigation :

- Isolement de la souche d'intérêt "*Lactococcus lactis*subsp. *lactis*" à partir du lait des deux espèces, cameline et caprine ;
- Optimisation des conditions de sa culture ;
- Production de bactériocine (de type nisine) et tests d'antagonisme à l'égard d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- Optimisation des conditions de conservation des souches d'intérêt isolées ;
- Essais de bio-conservation des viandes, cameline et de poulet par la substance bactéricide type "bactériocine" contenue dans les surnageants de culture et par celle produite *in situ* par les lactocoques camelins et caprins.

Partie I.

Synthèse bibliographique

1.1. Lait camelin

1.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques

Le lait camelin présente une couleur blanche due à sa structure et à la composition de sa matière grasse relativement pauvre en β carotène (SAWAYA *et al.*, 1989). Il forme une mousse très abondante à la traite et lors des transvasements. Ce pouvoir moussant est dû à sa richesse en composant-3-des protéose- peptones (PP3) par rapport au lait bovin (1.1 g /l versus 0.3 g/l) (SMAIL, 2002). Le PP3, protéine lactosérique native est en effet un bon agent émulsifiant, caractérisé par une thermorésistance élevée (GIRARDET *et al.*,1995).

Le lait de chamelle est légèrement sucré avec un goût souvent amère et/ ou salé. Cette diversité dans le goût dépend de la nature des plantes broutées (ABDELRAHIM, 1987 ;RAMET, 2003). Son pH fluctue entre 6.6 et 6.97 (BADAOUI, 2000 ; KHASKHELI, 2005 ; SIBOUKEUR, 2007) ; son acidité titrable est de l'ordre de 15° D. Sa viscosité moyenne est de l'ordre de 2.2 centipoises et sa densité se situe entre 1.022 et 1.032 (WANGOH *et al.* ,1998 ; CHERFI, 2002). Son point de congélation varie entre -0.53 à -0.61°C (HASSAN *et al.*1987).Toutefois, selon plusieurs auteurs, ces valeurs dépendent d'un certain nombre de facteurs, tels que le rang et le stade de lactation, la race, le type d'élevage, la saison de lactation. L'alimentation reste néanmoins, le facteur le plus déterminant (RAMET, 1993 ; MEDJOUR, 1994 ; MEHAIA *et al.*, 1995;WANGOH *et al.*,(1998)

D'après plusieurs auteurs, le lait camelin présente des teneurs équilibrées en nutriments de base à savoir les protéines, la matière grasse et le lactose. Sa composition biochimique globale fluctue selon les animaux et l'environnement. Elle présente des proportions similaires à celles présentes dans le lait bovin (SMAIL, 2002 ; SIBOUKEUR, 2007).

Les variations observées dans la composition de ce lait ont été attribuées à plusieurs facteurs, telsque les différentes procédures analytiques, l'emplacement géographique, les variationssaisonnières, les conditions d'alimentation et la race des chameaux (AL HAJ et AL KANHAL ,2010).

Selon leur solubilité dans un pH acide, les protéines sont réparties en en caséines et en protéines lactosériques .Les caséines camelinesprésentant un pHi similaire à celui des

caséines du lait caprin (pHi 4,3) sont précipitées à pH 4,3 (MATI,1992). Les protéines lactosériques qui restent solubles à pH 4,3, constituent la fraction protéinique majoritaire puisqu'elles représentent 73 à 81 % des protéines totales (MIETTON *et al.*1994 ;BADAOUI ,2000).

En plus de leur valeur nutritive élevée,les protéines lactosériques, jouent un rôle important dans l'auto-épuration du lait car elles possèdent pour la plupart uneactivité protectrice contre les attaques extérieures (BARBOUR*et al.* ,1984 ; EL-SAYED *etal.*,1992).Ce produit se singularise par l'absence de la β- lactoglobuline , principal allergène chez le nourrisson, comme c'est le cas du lait humain (BADAOUI,2000 ; SMAIL, 2002; SIBOUKEUR 2007).

Les teneurs en lactose du lait camelinfluctuent entre 2.5 et 5.6%, d'où son goût parfois sucré (GNAN et SHEREHA,1986; BAYOUMI,1990).

Sa teneur en eau, varie en fonction de sa disponibilité dans l'alimentation. Elle atteint une valeur maximale en période de sécheresse,. D'une manière générale, elle est présente dans le lait en quantité suffisante pour couvrir les besoins du chamelon (YAGIL et ETZION, 1980). En cas de restriction en eau alimentaire, le lait se traduit par une dilution (86%).

Dansun régime déficient, elle peut s'élever à 91% (FAYE et MULATO ,1991). Il semble selon l'avis de nombreux auteursqu'ils s'agissent d'un mécanisme d'adaptation au manque d'eau permettant de protéger le chamelon de la soif (SIBOUKEUR, 2007).

La composition en minéraux dans le lait camelin est plus diversifiée que celle dans le lait bovin.Il présente des teneurs plus élevées en oligoéléments(fer, cuivre,zinc, fluor et plomb) comparativement au lait de référence. Les macroéléments(sodium, potassium, calcium et magnésium) s'y trouvent en concentrations presque similaires en comparaison avec le lait bovin (BOUDJENAH *et al.* ,2009).

Ce lait se caractérise par sa richesse relative en niacine ou vitamine B3 (4.610 mg/kg) (SAWAYA*et al.*,1989) et en vitamine C (entre 25 et 60 mg/l))(SAWAYA *et al.*,1989 ; SIBOUKEUR,2007), teneur trois fois plus élevée que celle présente dans le lait bovin qui ne dépasse pas les 22mg/l (MATHIEU, 1998). Ses concentrations en vitamines, A, E et certaines du groupe B sont néanmoins plus faibles (FARAH, 1993).

Les caractéristiques de la matière grasse de ce produit se rapprochent de celle du lait humain.La matière grasse de couleur blanchâtre, du fait de son déficit en β carotène, est dispersée dans le lait sous forme de globules gras de petit diamètre (3µm versus 3 à 6 µm pour lelait de vache) (MEHAIA (1995). Selon SBOUKEUR,(2007) , ce caractère rend cette matière grasse plus digeste, comme dans le cas du lait humain. Cependant, il constitue une entrave au crémage donc à la technologie beurrière.

Dans le lait de chamelle,les lipides simples sont prédominants. Les triglycérides représentent 96 % des lipides totaux. Les stérides, les esters de cholestérol s'y trouvent avec une concentration de 9.98 mg/100g environ (MORRISON, 1968 ; GORBAN et IZZELDIN,1999 ; GORBAN et IZZELDIN,2001).Dans la fraction estérifiée des lipides de ce lait, le pourcentage des acides gras saturés est égal à 52% dont 18.4% représenté par l'acidepalmitique(GORBAN et IZZELDIN, 1999). Les acides gras insaturés sont représentés par l'acide oléique, l'acide palmitoléique. L'acide pelargonique (C_9 :0), l'acide décanoique(C_{10} :1) ont été trouvés avec des quantités relativement significatives en comparaison avec le lait bovin. Les AG à courtes chaines y sont relativement peu présents(GORBAN et IZZELDIN, 1999).

1.1.2 . Microbiologie du lait camelin

Du fait de sa composition en éléments de base(glucides, lipides et protéines), en sels minéraux et en vitamines, de sa teneur élevée en eau et de son pH voisin de la neutralité, le lait constitue un milieu favorable pour le développement des microorganismes. La présence de nombreux facteurs de croissance permet de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans des milieux moins complets. La nature et l'importance de sa microflore sont conditionnées par l'état sanitaire de l'animal, les conditions de traite, la température et la durée de conservation(LARPENT *et al.,* 1997a) .

Généralement, le laitrenferme peu de microorganismes (3000 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions et à partir d'un animal sain(GUIRAUD, 1998). Ces germes sontessentiellementdes germes saprophytes des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et bacilles. Lorsque l'animal est malade on peut y trouver d'autres microorganismes tel que *Staphylococcus aureus* issus de mammites.

Le lait peut être donccontaminé au cours de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine. Bien que les microrganismes contaminants soient très variés, seule

unepartie d'entre eux peut s'y multiplier si la température est favorable et le milieu est propice (LARPENT *et al.* ,1997a).

Le lait peut aussi être contaminé par des germes tels que les coliformes, les clostridiums issus des fèces et des téguments de l'animal, les listeria, les streptomyces issus du sol, une flore banale variée issue de la litière et des aliments, les Staphylocoques issus de vecteurs divers en particulier les insectes, le manipulateur (dans le cas de la traite manuelle), l'eau, les équipements de traite et le stockage (GUIRAUD, 1998).

Il en résulte que la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variabled'un échantillon à l'autre et suivant l'âge du lait.

Si la microflore du lait bovin a fait l'objet de nombreuses études, cela est loin d'être le cas du lait camelin où quelques travaux seulement lui sont consacrés. Selon SIBOUKEUR, (2007), l'une des principales raisons de cette carence est la relative absence des moyens matériels et humains (laboratoires, chercheurs…) tout près des lieux de collecte ce qui éviterait à recourir à la congélation ou à l'utilisation d'agents antimicrobiens, comme c'est généralement le cas des études physico-chimiques.

Parmi les travaux consacrésà la microbiologie du lait camelin, nous pouvons citerce qui suit:

- BARBOUR *et al.*, (1984) ont mis en évidence l'inhibition des bactéries pathogènes par le lait camelin. Ils attribuent cette activité antibactérienne à la présence de protéines protectrices (lyzozyme, lactopéroxydase , lactoferrine...) ;

-DURHAIMAN, (1988) a montré la présence d'une activité inhibitrice du lyzozyme extrait et purifié à partir du lait camelin sur *Escherichia coli* et*Micrococcuslysodeikticus* en le comparant à celui de l'ovalbumine ;

-EL-SAYED *et al.*,(1992) ont montré l'efficacité des protéines protectrices du laitcamelin contre*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Escherichia coli, Staphylococcusaureus, Salmonellaenterica* subsp. *enterica serovartyphimurium*et rotavirus ;

- AL- MOHIZEA *et al.*,(1994) qui ont trouvé que la qualité hygiénique du lait camelin est bonne. Ce résultat est obtenu après la numération de quatre groupes de microorganismes dans

ce lait à savoir : la flore aérobie totale, les psychrotrophes, les coliformes et les bactéries sporulantes ;

- YAGIL *et al.*,(1994) ont déduit que la pasteurisation du lait de chamelle n'était pas indispensable si les dromadaires du troupeau sont en bonne santé ;

- ABOU- TARBOUCH *et al.*,(1998) suggèrent l'utilisation de la poudre du lait camelin comme milieu de préculture de quatre espèce de bactéries bifidogènes (*Bifidobacterium breve, B.bifidum,B.longum et B. Angulatum)* ayant fait l'objet de son travail car cette flore à haut potentiel nutritionnel et thérapeutique (probiotiques) exige pour sa croissance la présence des acides aminés libres et de peptides comme source d'azote (prébiotiques) ;

-SIBOUKEUR *et al,.*(2002) ; SIBOUKEUR, 2007 ont mis en évidence un effet auto épuratif relativement puissant du lait de chamelle, notamment à l'égard des bactéries halotolérantes (*Staphylococcus aureus).*

- KARAM et KARAM, (2006), ont réalisé la numération de quatre genre de bactéries lactiques (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*) dans le lait camelin parmi lesquels des souches de lactococcus résistantes aux sels ;

-YATEEM et *al.*, (2008) ont isolés à partir du lait camelin des bactéries lactiques qui présentent un potentiel probiotique .Ces bactéries appartiennent aux espèces ; *Lb. plantarumLb. pentosus* et *Lc. lactis ;*

- SIBOUKEUR, (2007), a montré que le PP3 isolé par Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), possédait une action inhibitrice fortement prononcée contre les bactéries halotolérantes (*Staphylococcus aureus)*et assez peu prononcée contre les entérobactéries ;

- SIBOUKEUR,(2011), a montré que la production de bactériocine(type)nisine par les souches de Lc. camelins était plus conséquente en cas de stress de la souche, provoqué par addition de staphylocoques dans le milieu de culture ;

-SOUID,(2011) aétudié l' effet des bacteriocines (type nisine) produites par une souche lactique (*Lactococcus lactis*)isolée à partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe (*Pseudomonas fluorescens*) ;

- BOURICHA,(2011) a sélectionné des souches de *Leuconostoc mesenteroides* productrices de substances antimicrobiennes à partir du lait camelin

- GUATARNI ,(2013) a étudié l'effet antimicrobien des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus de chamelles, chèvre ,brebis et vache algériennes sur la croissance de *Helicobacter pylori.*

-MERZOUK,(2015) a procédé à une optimisation des conditions de fermentation et de préservation du lait cru de chamelles par des bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress.

De ce qui précède, il semble clair que le lait camelin se caractérise par un système protecteur assez puissant.Ce système serait le résultat d'une synergie mettant en œuvre l'association de plusieurs composés tels que : les protéines lactosériques protectrices(Lyzozyme, immunoglobulines, lactopéroxydase, lactoferrine,PP3), les acides organiques (acide lactique), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et des bactériocines produites par les bactéries lactiques (BARBOUR *et al.*1984 ; KLAENHAMMER *et al.*,1994 ;SIBOUKEUR ,2007).

1.1.2.1. Protéines lactosériques et effets antibactériens

***La lactoferrine** est présente en quantités relativement importante dans le lait des camélidés.Son action est due au captage du fer nécessaire au développement des micro-organismes notamment celui de *Echerichia coli.* Cette protéine présente une activité antimicrobienne,antivirale, anti-inflammatoire et analgésique(KONUSPAYEVA *et al.*, 2003). Elle présente un effet inhibiteur similaire à celui du lait bovin. Selon REITER, (1983) in ELSAYED*etal.*,(1992), les concentrations élevées en acide citrique dans le milieu diminuent l'activité inhibitrice de la LF. D'après EL- AGAMI,(1985) in EL-SAYED*et al.*,(1992) ; SAYED*et al.*,(1992), le lait camelin contient moins de citrate que le lait bovin, ce qui laisse donc supposer que sa LF cameline a une activité inhibitrice plus élevée

***La lactoperoxydase (Système LSP)**

La LP est une enzyme très efficace contre la croissance et l'activité des microorganismes nuisibles. L'efficacité de cette activité est d'autant plus importante que le lait renferme du soufre et du H_2O_2: système Lactopéroxydase –thiocyanate – péroxyded'hydrogène (Système LSP) actif. Ce qui est le cas du lait camelin riche en soufre

provenant des plantes broutées (Brassicacea et Asteracea des parcours sahariens) (CHEHMA, 2003). Le peroxyde d'hydrogène se forme par dissolution de l'oxygène de l'air dans le lait lors des différentes manipulations (traite, transvasement…) . L'action du système LSP résulte de l'oxydation de l'ion SCN^- en présence du peroxyde d'oxygène, qui fait apparaitre des oxy-acidesparmi lesquels l'hypothiocyanate($OSCN^-$) serait un puissant inhibiteur(KONUSPAYEVA *et al.* ,2003). Selon ELSAYED *et al.*, (1992), ces oxydes possèdent des propriétés bactéricides contre les bactéries à GRAM négatif mais bactériostatique contre les bactéries à GRAM positif.

***Les immunoglobulines** sont des protéines d'origine sanguine. Elles sont présentes dans leslaits de toutes les espèces. Ce sont protéines de faible mobilité éléctrophorétique et de poids moléculaire élevé(DE WIT, 1998). Leur fonction est d'assurer la transmission de l'immunité de la mère à son petit.Chez les ruminants, les Ig de la classe G sont les plusdominants (ALAIS et LINDEN,1997).

Selon EL-AGAMY (1994) in SMAIL,(2002) ; EL-AGAMY (1996);LAUWEREYS *et al.*,(1998) ,les Ig camelines présentent une similitude avec celles bovines. Elles diffèrent néanmoins par leurs poids moléculaires.

En 1998 ,des chercheurs ont mis en évidence l'existante de minianticorps dont la structure ne comporte que des chaines lourdes capables de s'incruster là où les anticorps classiques n'y arrivent pas(LAUWEREYS et *al.*,1998).

***Le composant 3 des protéose-peptones (PP3)**camelin connu également sous le nom de « lactophorine » est un homologue du PP3 bovin. Il s'agit d'une phosphoglycoprotéine composéede 135 résidus d'acides aminés (SORENSEN et PETERSON,1993). Elle contient plus de sérine et de glycine que lesprotéose-peptones en général (PP_5 et PP_8), par contre, elle contient moins de proline et de valine. Commeles protéose-peptones, ce composant contient peu d'acides aminés aromatiques (la cystéine etle tryptophane) (PAQUET *et al.*, 1982). Il se caractérise par une hydrophobicité élevée (PAQUET, 1989), ce qui en fait un bon agent émulsifiant.

Il exerce une action inhibitrice vis –à –vis des souches microbiennes de contamination du lait de chamelle (germes halotolérants entérobactéries pathogènes, entérobactéries totales).Selon SIBOUKEUR,(2007),les lactobacilles semblent résistants à l'action du PP3. Cela peut

s'expliquer par la présence d'un seul site de O-glycosylation, permettant de reconnaitre seulement la flore nuisible exogène.

***le lysozyme camelin** possède le même spectre d'activité que celui de l'œuf et un effet inhibiteur différent de celui du lactosérum bovin. Ce LZ camelin inhibe seulement *Salmonella typhimurium* et ne présente aucun effet contre *Staphylococcus aureus*.Contrairement au LZ bovin, il inhibe la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et n'a pas d'effet sur *Salmonella typhimurium* (EL-SAYED *et al.,* 1992).

1.1.2.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques produisent plusieurs substances ayant un effet antimicrobien contre les germes de contamination du lait. Ces substances peuvent être des acides organiques,le peroxyde d'hydrogène et/ou les bactériocines produites par les bactéries lactiques (SIBOUKEUR,2011 ;SOUID, 2011). Ces dernières feront l'objet d'une description dans les paragraphes ultérieurs.

1.2. Lait caprin

1.2.1. Caractérisation physico-chimique et biochimique

Le lait de chèvre se présente comme un liquide opaque de couleur blanchâtre mate, dû à l'absence de la β–carotène. Il est légèrement sucré, d'une saveur particulière et d'une odeur assez neutre (ALAIS, 1984). A l'état frais, il a un léger goût de chèvre dû à la présence d'acide gras caprylique (C8 :0) caprique (C10:0), et caproïque (C10:1),)qui confère au fromage de chèvre son goût prononcé particulier (JAUBERT, 1997 in DAOUDI,2006).Ce goût aurait pour origine l'alimentation, un traitement inadéquat ou un mauvais stockage du lait (BOYAVAL *et al.*, 1999).D'après JUILLARD *et al.,* 1996, le goût de ce lait est plus prononcé d'un lait à un autre selon la race caprine.

Le lait caprin présente un pH compris entre 6.45 et 6.60(GAUCHER et *al* ., 2007)avec une acidité titrable qui oscille entre 14 et 18°D (AMIOT et VIGNOLA,2002) .Sa densité oscille autour de 1.027 et1.035 à 20°C(ANONYME 2, 1990 ;FILIPOVITCH, 1954). Son point de congélation se situe entre -0 .550 et -0.583°C (AMIOT et *al.,* 2002).

Concernant sa composition biochimique, à l'instar des laits des autres espèces laitières, ce produit renferme des composés nutritifs,protéines, glucides et lipides.

Selon BRULE*et al.*,(1997), le profil en acides aminés totaux du lait de chèvre est proche de celui du lait humain. Ce lait se rapproche du lait humain du fait qu'il renferme moins de caséines 24,3g /l (soit 71%des protéines totales) et une valeur plus élevée d'azote non protéique2,3g/l (soit7% des protéines totales) par rapport au lait bovin.La β- lactoglobuline constitue la protéine majeure tout comme dans le lait bovin(DAVIAU *et al.*,2000).

Le lactose représente 40% des solides totaux. De faibles quantités de glucose et de galactose provenant d'une hydrolyse partielle (β-galactosidase) ont été détectées.Ces oses sont liés à des protéines(RAYNAL et REMEUF, 2000).

La matière grasse du lait caprinconstituée majoritairement de triglycérides et d'acides gras libres se présentesous la forme de globules gras dont le diamètre moyen est d'environ 3 µm versus 6 µm dans le lait de vache (WOLFF et FABIEN, 1998). Elle est riche surtout en acides, palmitique, oléique, butyrique, myristique,stéarique et caprique. Comparativement au lait de vache, le lait de chèvre contient plus d'acide caproïque, caprylique et caprique. En présence de lipases, ces acides gras peuvent être libérés. Des traitements technologiques, comme par exemple un brassage mécanique, peut briser les globules gras et rendre les triglycérides facilement accessibles aux lipases.

Sous sa forme libre, l'eau présente la proportion la plus importante dans le lait. Sous sa forme liée,elle constitue 4% de la totalité de l'eau.L'eau libre (96 % par rapport à la totalité de l'eau) est très réactive et favorise le développement des microorganismes contrairement à l'eau liée qui est non réactive et fortement liée aux protéines, à la membrane des globules gras et à certains sels minéraux. Cette dernière n'est pas affectée par les procédés classiques de transformation (VIGNOLA *et al.*, 2002).

Globalement, ce bioproduitcontient des teneurs en calcium à hauteur de 1,35g/l, en magnésium à raison de 0,14g/l environ, en potassium de l'ordre de 1,55g/l et en phosphore égales à environ 0,92 g/l.Ces minéraux sont présents à des concentrations supérieures à celles qui se trouvent dans le lait devache (PATEL *et* REUTER, 1996 inDAOUDI2006). Cette matière est répartie en deux fractions dont l'une est associée aux protéines et l'autre se trouve en solution (DAVIAU *et al.*, 2000).

Le lait caprin contient également des oligoéléments tels que le fer(0,55g /l),le cuivre (0,40g/l),le zinc (3.20g /l) et le manganèse (0,06g/l) (ST-GELAIS *et al.*, 1999 in BOUBEZARI,2010).

En ce qui concerne les vitamines, ce produit est particulièrement plus pauvre en vitamines,C,D, pyridoxine,B12 et acide folique. Le manque de ces deux dernières vitamines peut entrainer l'anémie chez les nourrissons alimentés au lait de chèvre (AMIOT et *al.*, 2002).

Les variations dans la composition du lait de chèvre sont dues à plusieurs facteurs tels que les facteurs génétiques, le nombre de vêlages, le rang de lactation, le moment de la traite. Elles dépendent également des facteurs zootechniques (mode de traite, nature de l'aliment, les soins vétérinaires…(PARADAL,2012).

1.2.2. Microbiologie du lait caprin

Selon PARADAL,(2012),ce lait contient trois types de microorganismes :

- les bactéries dont certaines sont très utiles telles que les bactéries lactiques constituant la flore originelle du lait caprin(tableau I) et d'autres sont nuisibles voire dangereuses provenant du milieu extérieur ;
- les moisissures qui préfèrent les milieux acides et qui sont utiles dans l'affinage du fromage ;
- les levures qui transforment les sucres en alcool.

Le lait caprin constitue un milieu favorable au développement de ces microorganismes du fait de sa richesse en éléments nutritifs, de son pH légèrement acide et des germes pathogènes qui se trouvent dans les premiers jets du lait à la traite.Les germes de contamination qui proviennent de l'extérieur, remontent par le canal du trayon.Afin d'éviter ces contaminants,il est nécessaire d'éliminer les premiers jets de la traite, de veiller à l'hygiène et à l'état du matériel(DROGOUL, et GERMAIN, 1998).

Deux types de floresont susceptibles de contaminer le lait dès sa récolte jusqu'à sa consommation : la flore d'altération et la flore pathogène ;

*la flore d'altération peut causer des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et limite l'utilisation du produit laitier.Les principaux genres identifiés dans cette catégorie sont :les Pseudomonas,Proteus, les coliformes (principalement

Escherichia et Enterobacter),les sporulés (Bacillus), certaines levures et moisissures (LAMONTAGNE et *al*., 2002).Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pasl'autre (VIGNOLA*et al.,* 2002).

*la flore pathogène est une flore issue de l'animal, de l'environnement et del'Homme (GUIRAUD, 1998).

Selon CONTRERAS*et al*, 1993 inDAOUDI,(2006),des études réalisées sur la flore microbienne du lait de chèvre ont mis en évidence la présence de *Staphylococcus aureus* dans 3 % de cas de mammites.

Tableau I.: Flore originelle du lait cru(VIGNOLA et al., (2002).

Microorganismes	**Pourcentage dans le lait(%)**
Micrococcus	20-60
Lactobacillus	20-40
Streptococcus et *Lactococcus*	< 20
GRAM négatif	< 5

Parmi les travaux portant sur la microbiologie du lait de chèvre nous pouvons citer :

-DIENG,(2001)dont l'étude porte sur la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois.L'auteur a constaté que l'ordre de grandeur de la flore lactique dénombrée dans ces laits est suffisant pourpermettre la fermentation lactique recherchée. Cependant, le refroidissementappliqué au produit, réduit leur nombre à environ $\sim 10^7$ au lieu de 10^8préconisé par les normes. Le chercheur a trouvé par ailleurs que malgré cela, ces micro-organismes de fermentation sont vivants et abondants dans les produits analysés et qu'aucun germe pathogène (anaérobies sulfito-réducteurs, staphylocoques présumés pathogènes et salmonelles) n'a été dénombré dans ces échantillons.L'auteur a trouvé aussi que la flore d'altération constituait la principale contamination retrouvée dansce lait, que 59 % de ces échantillons étaient non satisfaisants avec une prédominance des levures etdes moisissures devant les coliformes fécaux ;

-BADIS et *al.*,(2006) qui en caractérisant phenotypiquement des bactéries lactiques isoléesà partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle, ont constaté que le genre *Lactobacillus*était nettement prédominant dans la population Kabyle (61.48

%);suivi du genre *Lactococcus* (22.9%) puis du genre*Streptococcus* (8.88%) puis*Leuconostoc* (5.92%) et de loin *Pediococcus* (0.74 %), alors que les deux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* sont représentésde façon presque similaire dans la population Arabia (32.64 % et 31.02 % respectivement),ainsi que *Lactobacillus* (15.27 %), *Streptococcus* (14.82 %) et *Pediococcus* avec une faiblereprésentation (6.25 %). Ce même auteur a identifié 240 isolats selon les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques ce qui lui a permit de les rattacher aux 28 espèces présumées dont lesplus dominantes sont : *Lactobacillus helveticus* (29 isolats), *Streptococcus thermophilus* (23isolats), *Lactobacillus brevis* (20 isolats), *Lactobacillus caséi* subsp.*caséi* (20 isolats), *Lactobacillus plantarum* (16 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (14 isolats) et *Pediococcus.acidilactici* (12 isolats) ;

-DAOUDI,(2006) a isolé , caractérisé phénotypiquement et technologiquement des souches de bactéries lactiques mésophiles locales. Ces souches ont été utilisées par l'auteur dans la fabrication du fromage de chèvre dont les qualités, microbiologique, organoleptique et nutritionnelle ont été évaluées ;

-HANNACHI, (2008) a étudié l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 *et Bacillus cereus*ATC11778 par neuf souches de Leuconostoc isolées à partir du lait cru du chèvre et du fromage Roquefort ;

-RAYNAL-LJUTOVAC et *al.*(2008)ont étudié l'inhibition naturelle de la croissance de *St. aureus* dans les fromages au lait cru de chèvre ;

-BOUBZARI, (2010) a mené une étude portant sur la caractérisation physico-chimique et mycologique du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de jijel.

-DIB et *al* .,(2012) ont identifié et évalué l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels ;

-DJADOUNI, (2013), a isolé deux souches *Lb. plantarum et Pc. pentosaceus* à partir du lait caprin. Ces dernières présentent une forte activité antobactérienne contre *L. ivanovii.*

A l'instar des autres laits, le lait caprin possède un système protecteur qui agit par synergie consistant en une association de plusieurs substances antimicrobiennes à savoir :la

lactopéroxydase, le lysozyme , lessubstances antimicrobiennes secrétées par les bactéries lactiques.

1.2.2.1. Protéines lactosériques et effets antibactériens

***Lactoperoxydase**

La lactopéroxydase est une enzyme qui existe dans le lait de toutes les espèces à une concentration de 30mg/l.Cette enzyme a la capacité d'inhiber temporairement la croissance de quelques streptocoques et en tue d'autres.Son action est valable en présence d'eau oxygénée, du thiocyanate par le biais dusystèmeLSP (LE GRAET et BRULE, 1993)

***Agglutinines**

Les agglutinines sont des immunoglobulines qui représentent 18,3 % des protéines du lait de chèvre. Ces protéines possèdent des propriétés antigéniques et sont capables d'agglutiner certaines souches de bactéries lactiques à savoir les streptocoques du groupe N (DEBRY, 2001 inDAOUDI2006).

***Lysozyme**

Le lysozyme est une protéine basique stable à pH acide, même à des températures relativement élevées(BERGERE, 1984 inDAOUDI2006).Il est présent ende très faibles quantités dans le lait caprin. Cette protéine joue a un rôle important dans la conservation de la qualité hygiénique du lait (ST-GELAIS et SAVOIE, 1993 inDAOUDI ,2006).

1.2.2.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

Comme dans le lait de toutes les espèces,de nombreuss substances bactéricides secrétées par les bactéries lactiques permettent d'assurer son épuration. Parmi ces substances nous pouvons citer pour rappel les acides, le H_2O_2 , le diacétyl et les bactériocines qui seront détaillées ainsi que les microorganismes qui les produisent, dans la suite de cette synthèse bibliographique.

1.3. Bactéries lactiques

1.3.1 Généralités

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (DELLAGLIO,1994) .A quelques exception près,ces microorganismes lactiques ont pour principales caractéristiques d'être à GRAM positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, et de ne posséder ni catalase(certaines souches possèdent une pseudo-catalase),ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase.En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine(DELLAGLIO,1994).

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique(LABIOUI 2005).

Toutes ces bactéries ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant des glucides, produit soit exclusivement de l'acide lactique(bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique(bactéries hétérolactiques facultatives),soit de l'acide lactique, l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO_2(bactéries hétérolactiques strictes).Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire des acides, formique ou succinique (DELLAGLIO,1994).

Les bactéries lactiques sont classées en douze genres : Streptococcus, Lactococcus, Vagococcus, Enterococcus, Pedicoccus, Aerococcus, Tetragenococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium,Atopobium et Bifidiobactérium. Cette classification est réalisée selon plusieurs critères :morphologique, sérologique, génétique, écologique et moléculaire (DELLAGLIO,1994).

Ces bactéries colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Ces bactéries sont impliquées dans le domaine alimentaire (STILES et *al.*, 1997) où elles sont utilisées comme starter afin de permettre le développement de certains caractères organoleptiques. Elles sont utilisées également pour augmenter la durée de conservation des aliments car elles sont capables de synthétiser des substances antimicrobiennes qui attaquent les germes pathogènes et/ou d'altération des produits alimentaires (ABEE, 1995 ; HUGENHOLTZ et *al.*, 1999 ; SIBOUKEUR 2011).

1.3.2. Activité antimicrobienne

L'une des utilisations des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire est la conservation des aliments, "bioconservation" ou "bioprotection". La capacité de compétition de ces bactéries avec les microorganismes d'altération dans les milieux de fermentation industrielle résulte de la production des composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le H_2O_2et des protéines antimicrobiennes, les bactériocines.

1.3.2.1Acides organiques

Excrétés par les bactéries lactiques, ils assurent deux importantes fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (KLAENHAMMER *et al.*,1994). Ainsi, l'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les micro-organismes pathogènes qui exigent des pH neutres. D'autre part en condition acide, la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée, étant donné leur plus grande tolérance aux bas pH extra et intracellulaires (KLAENHAMMER*et al.*,1994).

1.3.2.2.Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène est connu depuis longtemps comme agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (PRICE et LEE,1970,DHIVA et SPECK,1969 in KLAENHAMMER *et al*, 1994 .Ces dernières sont à catalase négative et certaines souches peuvent accumuler du H_2O_2 lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en microaérobiose.La production peut avoir lieu selon plusieurs modes mettant en jeu des oxydases et probablement des superoxyde dismutase (SOD) (KLAENHAMMER *et al.*,1994).

1.3.2.3Bactériocines

1.3.2.3.1 Définition

Les bactériocines sont des substances antagonistes douées d'une activité bactéricide à l'encontre d'espèces proches de la souche productrice (KLAENHAMMER *et al.* ,1994). Ces substances sont des protéines ribosomiales synthétisées et libérées dans le milieu extracellulaire.Elles agissent à de très faible concentration, de l'ordre de la pico ou de la nanomole/l (HENG*et al.*, 2007 ; . PARADA *et al.* ,2007 ; GONG *et al.*,2009; RONGNE *et al.*, 2009 ; SAPATNEKAR et *al.*, 2010).

1.3.2.3.2 Caractéristiques générales

Les bactériocines peuvent détruire ou inhiber la croissance des bactéries pathogènes qui se disputent la même niche écologique ou la même source d'éléments nutritifs : d'où leur importance dans les industries agroalimentaires. Par exemple, la nisine produite par *Lactococcus lactis* subsp . *lactis*a un effet inhibiteur qui s'étend à la majorité des bactéries à GRAM positif tel que le *Clostridium botulinum* dans les fromages fondus (KLAENHAMMER *et al.* ,1994 ;BAYOUB*et al.*,2006). Elles ne sont pas fréquemment actives contre les bactéries à GRAMnégatif (RILEY et WERTZ, 2002).

La structure de ces substances est résistante à l'autoclavage. En plus, elle est stable à pH combiné au traitement thermique, ce qui veut dire qu'elle pourrait être utilisée dans le cas de préparations subissant un traitement thermique pour la préservation dans l'industrie agroalimentaire (BAYOUB*et al.*,2006).

Ces substances antimicrobiennes diffèrent des antibiotiques par leur spectre d'action qui est relativement étroit, par leur synthèse qui est ribosomiale contrairement aux antibiotiques qui possèdent une synthèse par un système enzymatique unique.Elles ne sont pas toxiques et sont rapidement digérées par les protéases dans le tractus digestif de l'Homme. En plus de cela et contrairement aux antibiotiques, chaque bactériocine possède son propre déterminant immunitaire dont le gène est lié au gène de la bactériocine, alors que les déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques ne sont pas liés, et sont exprimés indépendamment des gènes codant pour la synthèse d'antibiotique. Enfin,ces molécules sont généralement produites au cours de la phase de croissance et cessent d'être produites à la fin de la phase exponentielle.Leur production est souvent régulée par un système bi-composant de régulation alors que les antibiotiques sont des métabolites secondaires produits au cours la

phase stationnaire (NES *et al.* ,2002 ; RILEY M. A. et WERTZ J. E., 2002 ; WARDANI *et al.*,2006 ; PARADA *et al.* ,2007).

Les bactériocines diffèrent par leur taille, les souches cibles, le mode d'action et des mécanismes de l'immunité (RILEY et WERTZ, 2002).

Ces dernières années, les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont fait l'objet de plusieurs études .Néanmoins, tous les travaux consultés ont été réalisés sur les bactériocines produites par des souches isolées à partir du lait caprin .Parmi ces travaux, nous citons :

-DJADOUNI,(2013), a isolé à partir du lait caprin, deux souches bactériocinogéniques, *Lb. plantarum et Pc. pentosaceus*.Ces dernières présentent une forte activité contre *L. ivanovii* .Ce même auteur a caractérisé les bactériocines produites par les deux souches isolées.

- BAYOUB,(2006) a isolé des souches productrices de ces substances à partir du lait fermenté (Raib).

1.3.2.3.3. Classification

SelonKLAENHAMMER *et al.*,(1994),les bactériocines sont classées en trois principales classes, en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (PM) et génétiques :

-Classe I : ces bactériocines sont appelées « lantibiotiques» (*lan*thionine containing an*tibiotic* peptides). Ce sont des peptides de petite taille(<5 kDa), stables à la chaleur.Ces peptides contiennent des acides aminés inhabituels soufrés (la lanthionine, la β-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine) formés post traductionnellement.Les lantibiotiques agissent sur les structures membranaires (PARADA *et al.* ,2007 ; DORTU et THONART,2009 ;HENG et al.,2007;TODOROV ,2009). Cette classe de bactériocines est divisée en deux sous-classes en fonction des similitudes structurelles :

- **Sous-classe I a** : elle inclue, les peptides flexibles et chargés positivement. Ils agissent généralement en formant des pores dans les membranes cytoplasmiques des souches cibles sensibles. La nisine est un exemple prototypique de cette classe de bactériocine (PARADA *et al.* ,2007).

- **Sous classe I b** : elles sont typiquement globulaires, plus rigides dans lastructure et sont soit chargées négativement ou n'ont pas de charge nette. Les lantibiotiques de cette classe exercent leur action en interférant dans les réactions enzymatiques essentiellesdes souches cibles (DEEGAN*et al.*,2006)

-Classe II. :les Non-Lantibiotique: ou « pediocin-like bacteriocins ». Ce sont des bactériocines de poids moléculaires variables, mais généralement de petite taille(<10kDa). Elles sont thermostables, hydrophobes et douées d'une activité cytolytique .Ces bactériocines ne contiennent pas d'acides aminés modifiés (KLAENHAMMER *et al.*, 1994; PARADA *et al.*,2007 ; DORTU et THONART,2009).Cette classe comprend trois sous classes:

- **Sous classeIIa:** peptides actif contre le genre *Listeria.* Les bacteriocines caractéristiques qui représentent cette sous classe sont :la pediocine pediocin PA-1 et la sakacin P(VENEMA et al.,1997 ; PARADA *et al.*,2007).
- **Sous Classe IIb**: formée par un complexe de deux peptides distincts.Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires(DORTU et THONART,2009).

Dans cette sous classe, on trouve la lactococcine G et la plantaricine EF e JK(PARADA *etal.* ,2007).

- **Sous Classe IIc**: la sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes. Ce sont des petits peptides, thermostables, qui sont transportés par un leader peptide. Dans cette classe existe seulement la divergicine A et la acidocineB(DORTU et THONART,2009 ;PARADA *et al.* ,2007).

-Classe III. : des bactériocines de grande taille (›30k Da) sensibles à la chaleur et donc complexes quant à leur activité bactéricide et/ou leur structure protéinique. Dans cette classe figurent la helveticine J (JOERGER et KLAENHAMMER, 1986 ; VAUGHAM et al, 1992), l'acidofilicine A et la lactacine A et B. (KLAENHAMMER *et al.*,1994; PARADA *et al.* ,2007).

En complément à ces trois classes bien définies, CENATIEMPO et *al* ., 1996) a mentionné une quatrième classe hypothétique . Cette dernière contient les peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Toutefois, aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite par DORTU et THONART,2009 .

1.3.2.3.4. Mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (DORTU et THONART,2009)

- Mécanisme de production des lantibiotiques

Les gènes de biosynthèse des lantibiotiques ont été désignés par le symbole commun « Lan », avec un nom plus spécifique pour chaque lantibiotique (nis pour la nisine, par exemple). Le gène de structure, Lan A, code pour un prépeptide contenant une séquence N-Terminale de 23 à 30 acides aminés qui sera clivée lors du transport à l'extérieur de la cellule. Ce prépeptide subira différentes modifications post-traductionnelles afin d'acquérir les quatre acides aminés inhabituels. Plusieurs étapes sont impliquées dans ces modifications :

-une déshydratation de la sérine et de la thréonine pour former la déhydroalanine et la déhydrobutyrine ;

-la formation d'un lien thioéther entre ces résidus déshydratés et les cystéines environnantes, donnant aux lantibiotiques une structure cyclique.

Après ces modifications, le prépeptide sera clivé lors de l'excrétion hors de la cellule par la protéase LanP ou le domaine protéasique de l'ABC transporteur LanT. Cette dernière modification permettra d'obtenir le peptide biologiquement actif (MCAULIFFE et *al.*, 2001 ; LEEREBEZEM, 2004 ; XIE et al., 2004 ; PATTON et *al.*, 2005).

1.3. 2.3.5 .Applications des bactériocines dans l'industrie Agro-alimentaire :

La bio-conservation appelée aussi bio- préservation ou bio- protection est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des microorganismes ou des à «composés naturels» par opposition à l'utilisation de conservateurs dits « chimiques » classiquement utilisés dans les Industries Agro Alimentaires (GARRY et *al.*, 2008). Comme toute méthode de conservation, elle doit permettre non seulement de contrôler la croissance des flores, pathogène ou d'altération, mais également de préserver les qualités, organoleptique et nutritionnelle du produit tout au long de sa durée de vie. Il existe différentes voies permettant la biopréservation. Ainsi, il est possible d'utiliser directement des micro-organismes tels que les bactéries lactiques sur l'aliment. Ce procédé est connu depuis longtemps puisqu'il est traditionnellement utilisé pour la conservation des aliments telle que la fabrication des produits fermentés (fromages, végétaux…). Des substances issues du métabolisme de microorganismes peuvent également être utilisées afin de maîtriser le développement de bactéries indésirables GARRY et *al.*, 2008). Ces molécules appelées bactériocines sont synthétisées par les bactéries lactiques et sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments (LABIOUI,2005). . Pour le moment, seule la nisine fait l'objet d'une autorisation d'utilisation limitée (GARRY et *al.*, 2008).

Les bactériocines peuvent être appliquées comme additif alimentaire (d'un point de vue législatif) sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire (GUINANE et *al.*, 2005) . Elles peuvent aussiêtre appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple(DEEGAN et *al.*, 2006 ; GALVEZ et *al.*, 2007) . Il existe une autre mode d'application des bactériocines. Ce dernier consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides (les bio-emballages). La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation. En plus de cela dernièrement, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (LUCHANSKY et *al.*, 2004 ; DEEGAN et *al.*, 2006 ; GALVEZ et *al.*, 2007 ; DJENANE,2009) .

Enfin, la bioconservation est destinée à être utilisée dans le cadre de la technologie des barrières, c'est à dire en combinaison avec d'autres méthodes douces de préservation (réfrigération, emballage sous vide ou atmosphère modifiée, lumière pulsée (MATAMOROS ,2008)

1.3. 2.3.6. Utilisation des souches productrices de bactériocine dans les IAA

Les bactéries productrices de bactériocine peuvent être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ* (DORTU et THONART,2009)

Les bactéries sélectionnées pour être utilisées dans le cadre de la biopréservation doivent satisfaire aux quatre critères suivants :

- être préférentiellement isolées d'un produit similaire ;
- présenter une bonne aptitude à se développer au froid ;
- ne pas apporter de modifications de la qualité organoleptique du produit et
- inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et/ou d'altération.

Parmi les genres bactériens pouvant être cités pour leur action de bioprotection, il y a les *lactocoques, les lactobacilles* et les p*édiocoques*(GARRY et *al.*, 2008).La concentration cellulaire maximale requise dans le produit doit être inférieure à la 10^6cfu·g^{-1}, généralement admise pour les produits non fermentés(DORTU et THONART,2009). Cependant certains de ces germes sont utilisés depuis longtemps comme ferment, dans des produits alimentaires. Pour ce type de germes les autorités européennes ont défini le concept QPS (Qualified Presumption of Safety) qui confère à ces micro-organismes un statut de qualification de présomption conditionnelle d'innocuité ou QPS. Ce statut est l'équivalent du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) aux Etats unis avec quelques spécificités européennes.

Selon GARRY et *al.* (2008),le statut QPS d'une souche sera déterminé en fonction du groupement taxonomique de la souche, des connaissances sur le groupement taxonomique considéré permettant de tirer des conclusions sur son innocuité, de l'existence ou non de pathogènes connus dans le groupe taxonomique considéré et enfin de l'usage final prévu pour le produit.Les microorganismes considérés comme inadaptés à l'approche QPS devront être soumis à une évaluation complète pour s'assurer de leur innocuité.

La conservation à l'aide des microorganismes est toujours accompagnée de changement de goût et d'arôme ; pour cette raison, cette technique n'est appliquée que pour certains produits typiques .Il faut d'ailleurs remarquer que l'on ne peut garder de façon illimitée les bioconserves, surtout quand on change les conditions des produits (NOUT et *al* .2003).

1.3. 2.3.7.Utilisation de bactériocines combinées avec d'autres agents de conservation

Les bactériocines peuvent être utilisées également en combinaison avec d'autres agents chimiques ou physiques,ce qui donne des résultats promoteurs pour la conservation des aliments.Comme agent chimique,on peut citer des molécules tels que des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles(DJANANE *et al.*, 2012). Dans ces cas, l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être pris en ligne de compte.Des agents chélatantscomme l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate… permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries GRAM+ permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité.

Comme traitements thermiques,on peut citer le stockage sous atmosphère contrôlée, l'application de champs électriques ou l'application des hautes pressions (RODGERS, 2004 ; DEEGAN et *al.*,2006 ; GALVEZ et *al.*, 2007). D'autre part, selon KOUAKOU *et al.*, 2008. l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines par les protéases présentes dans le produit à conserver .

Il existe d'autres types de combinaison permettant d'augmenter l'activité et le spectre d'action des bactériocines. VIGNOLO et *al.*,(2000) , rapportent qu'une combinaison de différentes bactériocines , tout particulièrement celle des bactériocines appartenant à des classes différentes, permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action.

1.3. 2.3.8. La nisine

a/Définition

La nisine est un exemple prototypique de bactériocine de la classe des lantibiotiques (PARADA *et al.* ,2007).Cette substance antimicrobienne produite par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, est la seule bactériocine utilisée commercialement. Elle a été officiellement reconnue comme agent de conservation des fromages et des aliments en conserve par la "Food and Drug Administration " (FDA) en1988. Depuis ce temps, plus de 45 pays ont approuvé

cette molécule comme agent de conservation. Ceci fait de la nisine, la bactériocine la plus utilisée à travers le monde (GRENIER et *al.* 2004).A ce jour, c'est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire (E234) pour le contrôle microbiologique et sanitaire de certains aliments lactés, carnés, et conserves(RAIMBIAULT,1995 ; DAOUDI, 2000).

Cette molécule est un métabolite primaire et sa biosynthèse est fonction de la croissance cellulaire (PIARD et DESMAZEAUD, 1992 ; LE LAY, 2009).Elle est produite à l'état naturel par les *Lactococcus* trouvés dans des plantes vertes etdans le lait cru. Onze gènes sont impliqués dans la biosynthèse de la nisine. Ces gènes sont organisés en opéron .Ils sont portés sur un transposon qui estmobile et peut donc être localisé au sein du chromosome ou sur un plasmide (DAOUDI, 2000 ; CHEIGH *et al.*, 2005).

La nisine possède un large spectre d'activité. Elle est composé de 34 résidus amino-acyls et possède deux variants qui diffèrent seulement dans l'acide aminé numéro 27(substitution de His dans la nisine A par Asp dans la nisine Z).Ces derniers inhibent la plupart des bactéries à GRAM positif y compris les détériorants alimentaires comme le *Clostridium sp, Bacillus*,les micro-organismes pathogènes comme *Listeria monocytogenes,* et ceux qui causent la mammite bovine (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus dysgalactiae)* (RAIMBIAULT,1995 ; RYAN *et al*, 1998 ; DAOUDI, 2000 ; PARADA *et al.* ,2007). Elle est également active contre les pathogènes humains comme les *Staphylococcus aureus* résistants à la methicilline (MRSA)(PARADA *et al.* ,2007).

b/Propriétés chimiques et moléculaires de la nisine

La nisine, peptide produit par synthèse ribosomique, subit par la suite une modification enzymatique post-traductionnelle afin de donner une bactériocine biologiquement active (JUNG. 1991). Les propriétés fonctionnelles, la thermostabilité ainsi que de l'action bactéricide de la nisine sont dues à la présence de trois acides aminés non usuels, trois résidus insaturés (deux Dha et un Dhb) et de cinq résidus thioether et une lanthionine (D-AIa-S-Ala) et 4 β-methyllanthionine (D-Aba-S-Ala) (CHAN et *al.* 1989).

Les propriétés chimiques de cette biomolécule peuvent être résumées comme suivant :

- c'est un peptide cationique(VAN DER MEER et *al.* 1993) ;
- très soluble à pH acide (HURST,1981) ;
- présente une stabilité maximale à pH 3 à 37 et 75°C (ROLLEMA et *al.* 1995) ;

- son pH isoélectrique est égale à 8 (De VUYSR et VANDAMME. 1994) ;
- elle possède un caractère amphiphile, hydrophobe du côté N-terminal et hydrophile du côté C-terminal,ce qui explique sa tendance à former des agrégats et à adhérer à des surfaces hydrophobes (KUIPERS et*al.* 1991) ;
- elle est plus stable à des pH 3.4 et 7. A pH 2, 5% de son activité biologique , alors qu'elle est réduire de plus de 50% et 90% à pH 1 et 5 respectivement (DAVIES et *al.*, 1998 ;DELVES- BROUGTON,1990) ;
- elle est thermostable, résistante à la trypsine et inactivée par l'alfa-chymotrypsine et la pancréatine(RAIMBIAULT,1995, DAOUDI, 2000). Elle est par ailleurs résistante à la pronase, à la pepsine, à l'élastase et à la trypsine (JARVIS ET -IAHONNEY, 1969).

c/Mode d'action de la nisine

Toutes les bactériocines des bactéries lactiques dont le mécanisme d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. Cependant, sans qu'une explication puisse être fournie, un effet bactériostatique a été décrit pour certaines bactériocines alors que pour d'autres, quelquefois très proches des précédentes, il est clairement bactéricide. D'autres différences résident dans la nécessité d'un potentiel membranaire et une action directe sur les structures phospholipidiques(le cas des lantibiotiques) ou à l'inverse un mécanisme dit voltage-indépendant, mais nécessitant une interaction initiale avec un récepteur de nature protéique (exemple, la lactococcine A). Dans tous les cas de figure, la formation de pores membranaires a pour conséquence directe l'efflux d'ions ou encore de petites molécules comme des acides aminés (CENATIEMPO,et *al* .,1996). La taille des bactériocines de classe I ou II ne permettant pas à une seule molécule de perforer la membrane plasmique, les modèles existants font état d'une action coopérative de plusieurs molécules de bactériocines pour aboutir à la création de pores, dont la taille dépend du nombre de molécules associées. Ces modèles semblent cohérents avec les données expérimentales actuelles, mais demandent à être affinés à l'échelle moléculaire (CENATIEMPO et *al* .,1996).

Selon d'autres auteurs,la nisine possèderait un double mode d'action antimicrobienne. Elle se lierait aux phospholipides, inhiberait donc la synthèse de la paroi cellulaire et formerait des pores au niveau de la membrane cytoplasmique de la souche cible et donc la dépolariserait (ANONYME 1,2005; PARADA *et al.*, 2007; GONG *et al*,2009).

1.3. 2.3.9. Souche productrice de nisine : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

a/Généralités

La première étude sur les lactocoques a été entreprise en 1873 par Joseph LISTER. Ce chercheur avait tenté de prouver la théorie de Pasteur pour la fermentation lactique. Durantces expériences, il a obtenu la première culture bactérienne pure. Il lui donna le nom de « *Bacterium lactis* ». Ces bactéries sont plus tard renommées «*Streptococcus lactis* » par ORLA- JENSEN, (1919). En 1985, SCHLEIFER et ses colaborateurs proposent la séparation des streptocoques du groupe N des streptocoques oraux,des entérocoques et des streptocoques hémolytiques et proposent le genre « lactococcus » (TEUBER et GEIS,2006). Ce genre est formé de bactéries à GRAM positif. Ces dernières sont en forme de coques regroupées en chaînettes de longueur variable. Elle ont un métabolisme homofermentaire et produisent exclusivement de l'acide lactique L(+).Elles se distinguent par la présence, dans leur enveloppe d'antigène du groupe N, par leur température de croissance minimale inférieure ou égale à 10°C et optimale voisine de 30°C ,par leur thermosensibilité et leur inaptitude à croitre en présence de 6.5% de NaCl et à pH 9.6(DELLAGLIO et al.,1994)

La taxonomie moléculaire des lactocoques permet la détection et la différenciation de nouvelles espèces : *Lc. lactis,Lc. garviae, Lc. raffinolactis,Lc. paltarum* et *Lc. Piscium* (TEUBER et GEIS,2006).

b/ Exigences nutritionnelles

Les lactocoquesontune faible aptitude biosynthétique. Elles requièrent non seulementdes substances complexes carbonées, azotées, phosphatées et soufrées mais aussi de très nombreux facteurs decroissance sont nécessaires à leur multiplication en particulier des acides aminés et des vitamines du groupe B (KONING et *al.,* 1994). L'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis*possède une faible aptitude biosynthétique comme toutes les bactéries lactiques, en l'occurrence les lactocoques. Cette souche exige pour sa croissance la leucine, l'histidine, la valine, le glutamate, l'isoleucine et la méthionine. Elle exige aussi, la présence de vitamines (vit B12, biotine...), des acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide oléique et des acides nucléiques, des cations tels que le magnésium et des sucres fermentescibles (DESMAZEAUD et De ROISSART, 1994 ; OLEIVERA *et al.*, 2005).

c/Transport et métabolisme des sucres

SelonNEVES *et al.*, (2005), il existe trois méthodes de transfert des sucre chez les lactocoques :

- Le système phosphoenolpyruvate- photransferase (PEP-PTS) qui participe à la fois au transport et à la phosphorylation des sucres au détriment de la PEP, ce qui entraîne l'accumulation du phosphate glucidique correspondant (transfert de groupe) ;
- Le transport du sucre lié aux ions: c'est un système de transport secondaire dans lequel le transport de sucre est entraîné par un gradient d'ions ;
- Le transport des glucides par des ATPases : ce sont des systèmes de transport primaire couplant l'hydrolyse de l'ATP avec la translocation (systèmes de transport ABC).

D'un point de vue bioénergétique, le système PTS est probablement le plus efficace.

Selon CASTRO *et al.*,(2009) chez *Lactococcuslactis,*le glucose est transféré par deux systèmes phosphoenolpyruvate distincts :le système de phosphoenolpyruvate – phosphotransferase (PEP-PTS) et un ou plusieurs non PTS perméases inconnus.

Le principal système de transport du glucose de *Lactococcus lactis*est formé par la Glucose – PTS. Pour le lactose, il est transféré grâce à une lactose- PTS inductible codé par un plasmide (KONINGS *et al.* ,1994).

D'aprés THOMPSON et GENTRY-WEEKS,(1994), les bactéries appartenant au genre *Lactococcus lactis* ont la capacité de fermenter divers monosaccharides, disaccharides, et occasionnellement des hexitols. La voie d'EMP sert dans tous les cas, de voie principale de dégradation des dérivés phosphorylés. Le glucose subit une phosphorylation au cours de sontransport par le système PEP-PTS et le G_6P accumulé est ensuite fermenté en acide lactiquepar la voie d'EMP. Le lactose est aussi métabolisé par fermentation homolactique, comme leglucose (figure 1).

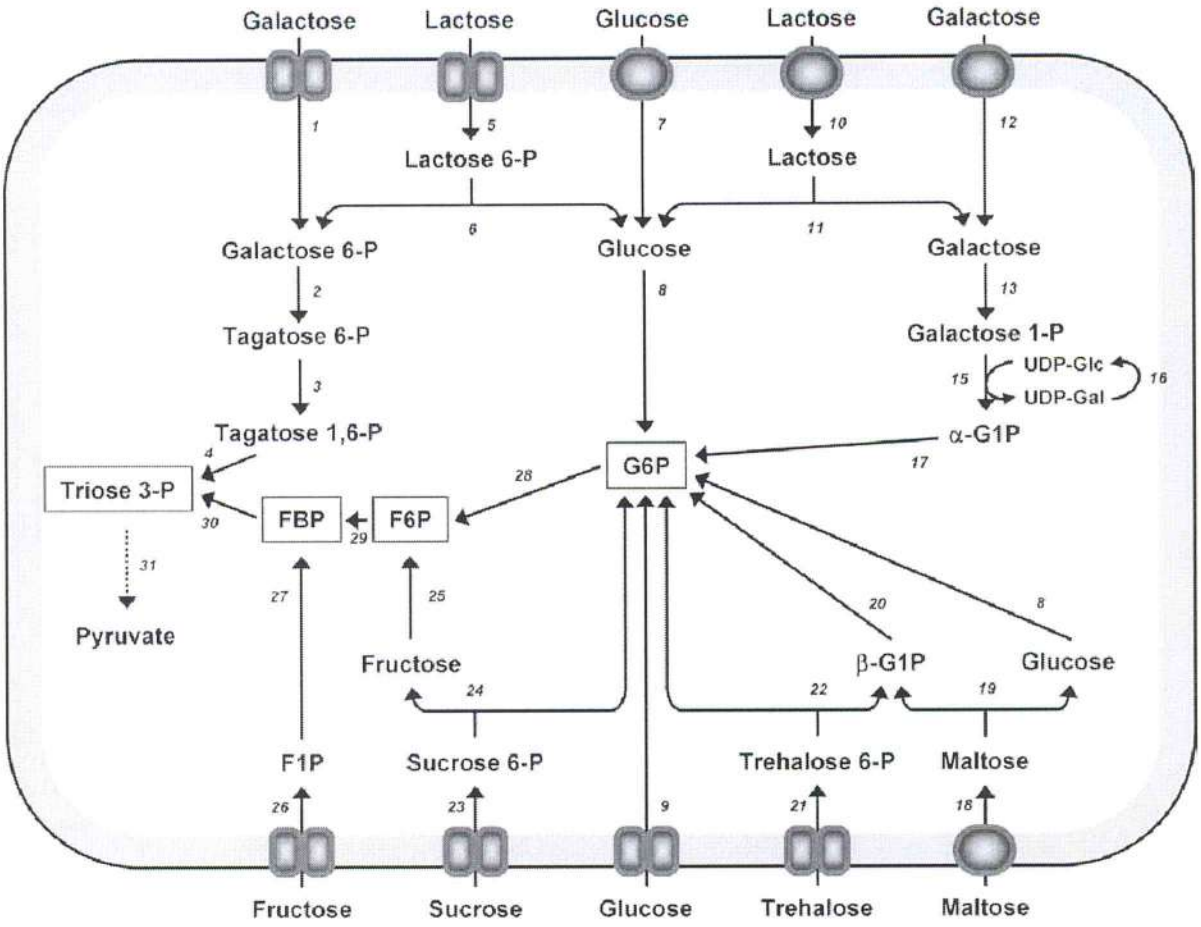

Figure 1 : Les différentes voies de transport et le métabolisme initial des sucres(mono et disaccharides) chez *Lactococcus lactis(* NEVES *et al.*, 2005)

1.4. Microbiologie de la viande

Du point de vue nutritif, la viande est une substance riche en eau, en protéines de haute valeur et en graisses. En revanche, elle contient très peu de glucides sous forme polysaccharidique (le glycogène). C'est un substrat favorable au développent des microorganismes, essentiellement des microorganismes protéolytiques qui génèrent des modifications néfastes de l'odeur, de la couleur et de la texture et produisent des substances d'une grande toxicité. Il s'agit d'un produit fragile qui en raison du danger présenté par les altérations et la présence éventuelle de germes pathogènes doit être strictement surveillé (GUIRAUD, 2012). De nombreux travaux continuent à être consacré aux viandes rouges et blanches conventionnelles telles que celle du bœuf, du mouton, du poulet, de la dinde ...etc. Ces derniers sont surtout accès sur leur conservation requérant des moyens drastiques tels que l'utilisation d'atmosphère contrôlée et/ou le recours à des additifs alimentaires conservateurs, des bioemballages ...etc.(DJANANE,2005).

La viande cameline fait l'objet d'investigations scientifiques dans certains pays tels que le Kasakistan, leSoudan et les Emirates Arabes Unies, du fait de sa large consommationpar ces populations (AL-KHARUSI et *al.*2012 ; GHADA et NOUR 2012 ; MOHAMED et MANAL .2012; RAIYMBEK et *al.* 2012).

En Algérie, la contamination superficielle d'origine bactérienne, de 60 carcasses camelines a été évaluée par une équipe de chercheur de l'U.K.M.Ouargla (BENAISSA ,2011 ; BENAISSA ,2014 a ; BENAISSA ,2014b ; BENAISSA et *al.*, 2015). Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage à partir de trois sites (cuisse, flanc et épaule). Les échantillons ont été prélevés dans un intervalle d'une heure après l'abattage de l'animal, après le dépouillement, à la fin de l'éviscération et avant l'inspection post- mortem. Les taux de germes varient en fonction des carcasses et des sites de prélèvement, selon l'auteur. La flore prédominante enregistrée est la flore aérobie mésophile totale, dont le niveau de contamination a été de 2,8 log UFC/cm^2, représentant 25 p. 100 de la flore dénombrée, suivie par les entérobactéries avec 2,4 log UFC/cm^2 (21 p. 100), les coliformes totaux avec 2,2 log UFC/cm^2 (20 p. 100), les coliformes fécaux avec 2,0 log UFC/ cm^2 (18 p. 100), et les staphylocoques avec 1,8 log UFC/cm^2 (16 p. 100). La présence de souches de salmonelles et d'*Escherichia coli* a été détectée sur toutes les zones prélevées de la carcasse. La viande cameline de l'abattoir de Ouargla a présenté un niveau de contamination élevé par les germes pathogènes (salmonelles et staphylocoques). Une contamination fécale (E. coli) élevée a également été observée. De bonnes pratiques d'hygiène durant la phase d'abattage doivent

être mises en œuvre afin de diminuer le niveau de contamination (**BENAISSA et *al.*, 2015).** Ces auteursont mis en évidence l'effet conservateur d'un acide organique souvent utilisé dans les industries agroalimentaires et toléré par la législation nationale, l'acide citrique. Ce dernier été utilisé afin de prolonger la durée de conservation de la viande cameline réfrigérée. L'évaluation de la vitesse de la prolifération microbienne de certains germes de contamination de la viande cameline conservée par réfrigération et préalablement traitée par cet acide a été étudiée. Les résultats de dénombrement de certains germes révèlent l'absence des anaérobies sulfito-réducteurs et des Staphylococcus aureus et la présence de la flore aérobie mésophile totale, des levures, des entérobactéries et des coliformes fécaux, dont les pourcentages étaient respectivement de 30,26%, 26,55%, 22,74% et 20,44%. La durée de conservation de la viande étudiée a été de 9 jours vis-à-vis de la majorité des germes dénombrés à l'exception des levures (7 jours). L'utilisation des solutions de l'acide citrique à des concentrations répandant à la réglementation en vigueur, semble, selon les mêmes auteurs, contribuer à la prolongation de la durée de conservation de la viande de dromadaire.

Les volailles et les produits dérivés peuvent contenir des germes issus de la flore originelle de l'animal (*Salmonella, Campylobacter*). Des contaminations sont favorisées par l'échaudage et la plumage (pour cette raison, celle-ci se fait parfois à sec), par les germes intestinaux au moment de l'éviscération, par les manipulations et l'environnement. Les germes les plus fréquents sont les suivants : Pseudomonas, Alcaligenes, Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus, *Staphylococcus aureus,* Campylobacter, *Clostridium perfringens,* Salmonella *(S. enteridis),* Listeria, des coliformes et des levures. Les détériorations qu'ils provoquent sont généralement des altérations de surface lorsqu'il s'agit de produits peu ou pas découpés, ce qui ne favorise pas la pénétration des germes dans la viande . La décontamination des viandes de volaille peut se faire par des produits chimiques (pratique non autorisées en France), par cuisson ou par ionisation (dans le cas des viandes séparées mécaniquement) (GUIRAUD, 2012).

Partie II.
Matériel et méthodes

II .Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé dans cette étude trois et cinq échantillons de lait de mélange en provenance de chacune des deux espèces cameline et caprine respectivement.

2.1.1. Lait de chamelle

Ces échantillons de lait proviennent de chamelles saines appartenant à la population Sahraoui, vivant en extensif dans la région de Ouargla. Ils sont collectés dans des flacons stériles et transportés au laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

2.1.2. Lait de chèvre

Les 05 échantillons de lait, utilisés dans cette étude, proviennent de chèvres domestiques saines vivant dans la région de Ouargla. Le lait est collecté dans des flacons stériles et transportés au laboratoire de microbiologie.

2.1.3. Viande cameline

Elle a été achetée dans une boucherie au centre ville de Ouargla juste au moment de sa livraison par l'abattoir de Ouargla.

2.1.4. Viande de poulet

Elle a été achetée également auprès d'une boucherie, quelques heures après sa livraison par le fournisseur.

Ces deux types de viandes ont été choisies à cause de leur large consomation par la population locale.

2.1.5. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) ; Université de Tlemcen. Il s'agit de :

**Staphylococcus aureus* (ATCC25923)utilisée comme souche cible. Le choix de cette espèce se justifie par les points suivants :

- Sa sensibilité aux bactériocines (CHOI, 2000 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010), notamment à la nisine (RAIMBIAULT,1995 ; SHARMA *et al.*, 2010) ;
- Son appartenance à la microflore contaminante des produits alimentaires (TRIAS,2008) ;
- Sa résistance aux antibiotiques (RAHAL, 1984) ;
- Son caractère catalase positive, permettant donc de lever l'effet inhibiteur du H_2O_2
- Son caractère pathogène ;
- Sa culture facile en milieu hypersalé.

**Lactococcus lactis subsp lactis* identifiée génétiquement, et utilisée comme souche témoin.

2.1.6. Appareillage

- Etuve bactériologique (MEMMERT)
- Autoclave (Systec 5075 MLV);
- Incubateur agitateur (Heidolph Inkubator 1000) ;
- Réfrigérateur (IRIS)
- Congélateur (WHRILPOOL)
- Centrifugeuse réfrigérée max 4000 (RETINA 80 Rm)
- Compteur de colonies(FUNKE GERBER)
- Loupe binoculaire (SINAL)
- Microscope optique (MOTIC)
- Spectrophotomètre visible / UV (SCHIMADZU).
- Balance analytique(DENVER)
- Mixeur (MOULINEX)

2.1.7. Réactifs

-Eau physiologique

- Eau peptonnée
- Solution de Soude (1N),
- Solution d' HCl (1N),

- Bouillons M17, MRS(ANNEXE 1 et 2) ;
- Géloses M17 et MRS;
- Milieu de conservation (ANNEXE 3) ;
- Gélose Baird Parker (ANNEXE 4);
- Milieu PCA (ANNEXE 5);
- Gélose Mueller Hinton solide et semi solide;
- Fructose
- Glucose

2.2. Méthodes analytiques

2.2.1. Tests préliminaires

Les échantillons de laits, camelin et caprin, subissent dès leur arrivée au laboratoire, la mesure du pH, de l'acidité titrable, et un test de la réductase afin de déterminer la qualité hygiénique du matériel d'étude.

2.2.2. pH

La mesure du pH est réalisée par pH-métrie. L'électrode de référencepour la mesure de la concentration en ions H+ est l'électrode à l'hydrogène (LEHNINGER, 1981).

2.2.3. AciditéDornic

L'acidité du lait, exprimée en degré Dornic, est le nombre de ml d'hydroxyde de sodium 0.11 N nécessaire pour neutraliser 10 ml de lait en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré (1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait normes(FARAH *et al.* ,2004) (ANNEXE6). L'acidité Dornic témoigne de l'état de fraîcheur du lait et de sa richesse relative en caséines, en phosphates, en citrate, en hydrogéno-carbonate et en lactate (SIBOUKEUR ,2007).

2.2.4. Test de la réductase

Le test de la réductase permet d'estimer la charge microbienne des échantillons de lait collectés. Son principe est basé sur la décoloration du bleu de méthylène. La rapidité de cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents. Plus l'activité

microbienne est forte, plus courte sera la durée de décoloration deséchantillons (LARPENT *et al.*, 1997a)(ANNEXE 7).

2.2.5. Isolement des souches de lactocoques

Selon LARPENT et *al* ,1997b ; NISSEN et *al* ,1992, la culture des lactocoques,*Lactococcus lactis subsp lactis,* productrice de nisine en l'occurrence , peut se réaliser sur le milieu Elliker, le milieu Chalmers, M17 ou Mac Kay à 30C°.Selon SHARMA et *al.*,(2010),l'utilisation de milieu MRS modifiés est toutefois possible. Dans la présente étude nous avons effectué des ensemencements sur gélose M17. Le milieu MRS est utilisé dans cette étude dans un but d'essai d'optimisation des conditions de culture de cette espèce.

2.2. 5.1. Préparation des dilutions

Nous avons utilisés le même diluantpour le lait camelin et le lait caprin. Ce diluant est adapté pour les bactéries aérobies mésophiles. Sa composition est la suivante : 1g de peptone pancréatique de caséine ,8.5g de chlorure de sodium pour 1000 ml d'eau distillée (LARPENT *et al.*, 1997a).

Des dilutions sont préparées à partir de la solution mère jusqu'à la dilution10^{-7}.

2.2. 5.2. Ensemencement sur gélose M17

Nous avons effectué un ensemencement en surface du fait que la majorité des bactéries lactiques, notamment celles appartenant au genre Lactococcus, sont aéro-tolérantes (DELLAGLIO, 1994).

Ainsi, 0.1ml de chaque dilution sont ensemencés à la surface d'une gélose M17 stérile, après solidification de cette dernière. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 48 à 72 heures(LARPENT *et al* ,1997a ; MADIGAN *et al.*, 2007)

2.2. 5.3 Examen des colonies développées

Après ensemencement des différentes dilutions de lait des deux espèces laitières, sur gélose M17 nous avons procédé à l'examen des colonies obtenues. Des observations macroscopiques des colonies et microscopiques des formes unitaires sont effectuées. Parallèlement, des tests physico-chimiques et biochimiques sont réalisés (figure 2).

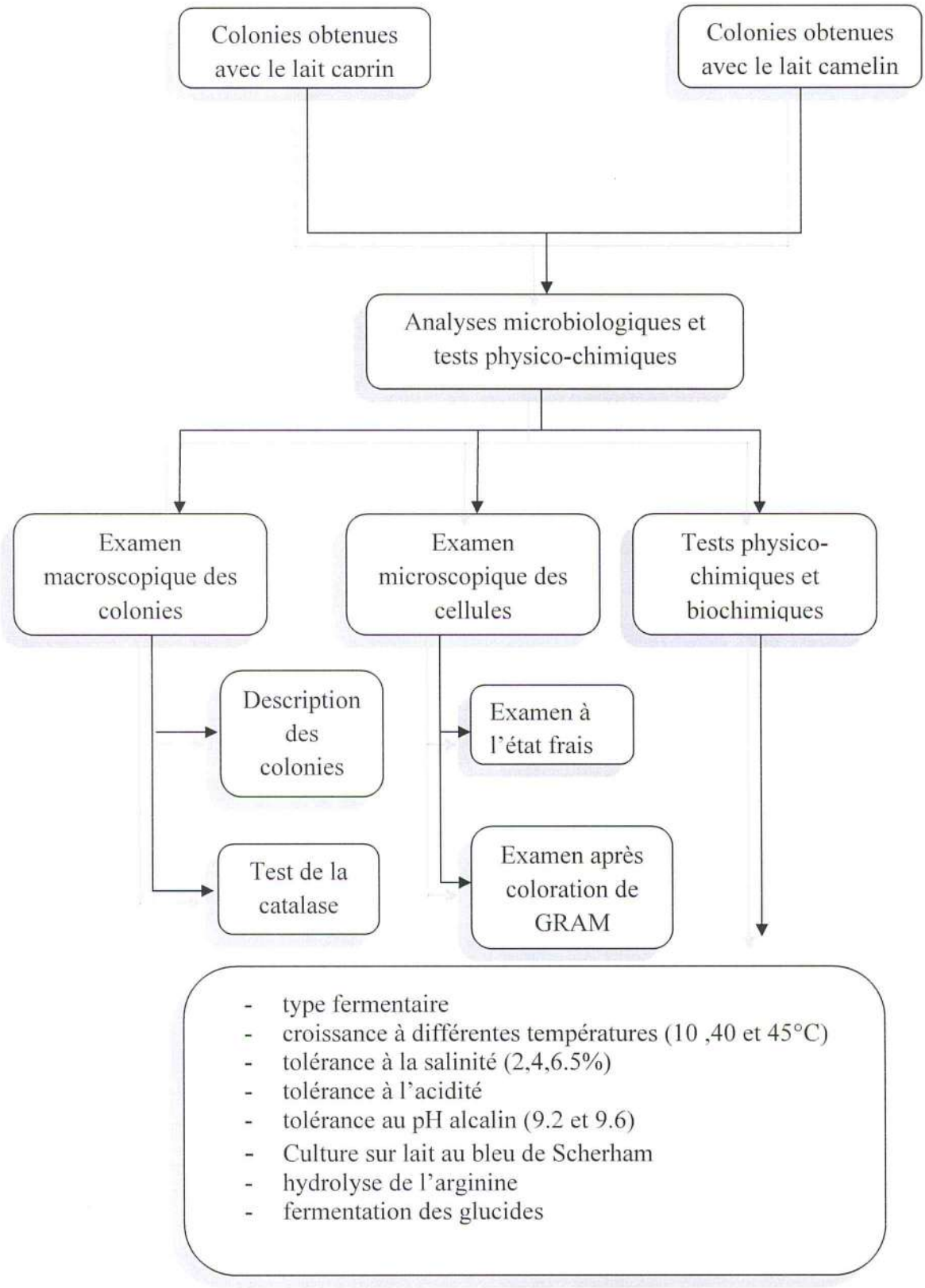

Figure 2 : Procédure expérimentale de pré- identification des souches isolées

2.2. 5.4. Examen macroscopique

Il consiste en une description macroscopique des colonies et en un test de la catalase. L'examen macroscopique des colonies obtenues après isolement de la souche d'intérêt porte sur la description de :

- **La taille** approximative;
- **La forme,** caractérisée par l'allure des contours qui peuvent être lisses, dentelés, déchiquetés ;
- **La surface** (forme en relief) peut être bombée ou plate. Le centre est parfois surélevé, parfois« ombiliqué »ou« creux »;
- **L'aspect de la surface** qui peut être lisse, brillant (type S «smooth» : lisse), rugueux ou mate(type R «rough»: rugueux);
- **La coloration :** la plupart des colonies n'ont pas de couleur définie. Elles sont jaunâtres, grisâtres, ou blanchâtres mais certaines élaborent un pigment qui donne à la colonie une teintefranche : jaune, rouge, violette ; parfois le milieu lui même se colore, cas fréquent d'unpigment bleu- vert. La pigmentation est un caractère d'identification important ;
- **La consistance :** les colonies peuvent avoir un aspect muqueux comme elles peuvent êtrefilantes, grasses, crémeuses (qui se mettront facilement en suspension) sèches, pulvérulents (qui se dissocieront mal dans l'eau) (MARCHAL *et al.*, 1982) ;
- **L'opacité :** les colonies sont dites opaques si elles ne laissent pas passer la lumière,translucides si elles laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers,transparentes, si elles laissent passer la lumière et on voit les formes au travers (MARCHAL*et al.*, 1982).

La catalase catalyse la réaction de dégradation de l'eau oxygénée. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraiche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et une colonie y est réparti: un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles (effervescence) traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (GUIRAUD ,1998):

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$$

2.2. 5.5. Examen microscopique

L'examen microscopique des formes unitaires des colonies obtenues consiste en leur examen à l'état frais et après coloration de GRAM avec un objectif 100 à immersion.

2.2. 5.6. Caractérisation physico-chimique et biochimique des souches isolées

Les souches isolées subissent des tests d'identification physico-chimiques et biochimiques (tableau II).

Tableau II : Test de pré-identification physico-chimique et biochimique des souches isolées

Tests	Principe	Réaction positive
Type fermentaire	Du bouillon M17 est ensemencé en présence d'une cloche de Durham,et incubé à 30°C pendant 24h	Apparition de bulles de gazdans la cloche de Durham
Croissance àDifférentes température	Du bouillon M17 est ensemencé etincubé à 10 °C pendant 7 jours, à(40°C et à 45°C) pendant 24h	Trouble du lait
Tolérance à la salinité	Du bouillon M17 à desconcentrations de 2%, 4% et 6.5%de Na Cl est ensemencé et incubéà 30°C pendant 24 h	Trouble du bouillon
Tolérance au pH alcalin	Du bouillon M17 alcalinisé à pH9.6 et 9.2 est ensemencés et incubéà 30°C pendant 24h	Trouble du bouillon
Culture sur lait au bleude Sherman	9 ml de lait additionné de 1 ml debleu de méthylène à 1% sontensemencés et incubés à 30°C pendant 24 h	Décoloration du bleu deméthylène qui se traduit par sa réduction
Hydrolyse de l'arginine	galeries API20 E	Le virage de couleur indique l'hydrolyse de l'Arg
Fermentation des Glucides	galeries API20 E	Le virage de couleur indique la fermentation du sucre

2.2. 5.7. Purification des souches

La souche isolée à partir du lait de chacune des deux espèces laitières étudiées, est purifiée par 05 repiquages successifs.

2.2. 5.8. Optimisation des conditions de culture des souches d'intérêt, isolées

Dans le but de suivre la croissance de la souche d'intérêt, nous avons procédé à la réalisation de courbes de croissance dans les deux milieux de culture M17 et MRS.

2.2..5.8.1. Réalisation des courbes de croissance

Une propagation de la culture suivant le protocole adopté par DOUMANJI *et al.*, 2010 et SIBOUKEUR,2011 est réalisée en prélevant une colonie de lactocoquespréalablement purifiée. Cette colonie est inoculée à 1 ml de bouillon (M17 ; MRS) puis incubée à 30°Cpendant 24 heures. Une «culture intermédiaire 1» est alors obtenue. Nous avons utilisé deux tubes. Un deuxième repiquage de cette culture précédente dans un tube contenant 9 ml de bouillon (M17 ; MRS) constitue la deuxième culture : la «culture intermédiaire 2». La culture est incubée pendant 72 heures à 30°C. La culture intermédiaire 2 est utilisée pour inoculer 90ml de milieu de M17 et MRS : culture mère à 10%. Après distribution de cette solution à 10% dans des tubes à essais, nous avons procédé à l'incubation 30°C pendant 48 heures (figure3). La croissance cellulaire est déterminée toutes les 2 heures par turbidimétrie et par le suivi de l'évolution du pH. Une courbe de croissance par milieu de culture est alors tracée (figure3).

2.2.5.8.2. Mesure de la croissance

Lorsqu'une suspension cellulaire dans un milieu limpide est traversée par un faisceau lumineux monochromatique, elle absorbe une quantité de lumière qui est proportionnelle à sa concentration cellulaire selon la loi de Beer Lambert (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991). Ce phénomène se traduit par une turbidité du milieu. Celle-ci est proportionnelle à la quantité de biomasse, lorsqu'elle ne dépasse pas la limite 0,5- 0,6 en unité d'absorbance (ONER et ERIKSON, 1986), d'où nécessité de procéder à des dilutions.

La croissance bactérienne est donc suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm tout au long de la durée d'incubation. Une courbe d'étalonnage la DO=f (concentration cellulaire) est utilisée dans ce dosage. Pour ce faire une gamme étalon est préparée avec différentes dilutions obtenues à partir de la culture mère à 10%,la concentration cellulaire correspondant à chaque dilution étant déterminée à l'aide de la cellule de Malassez.Une mesure du pH est effectuée parallèlement pendant la durée de l'incubation.

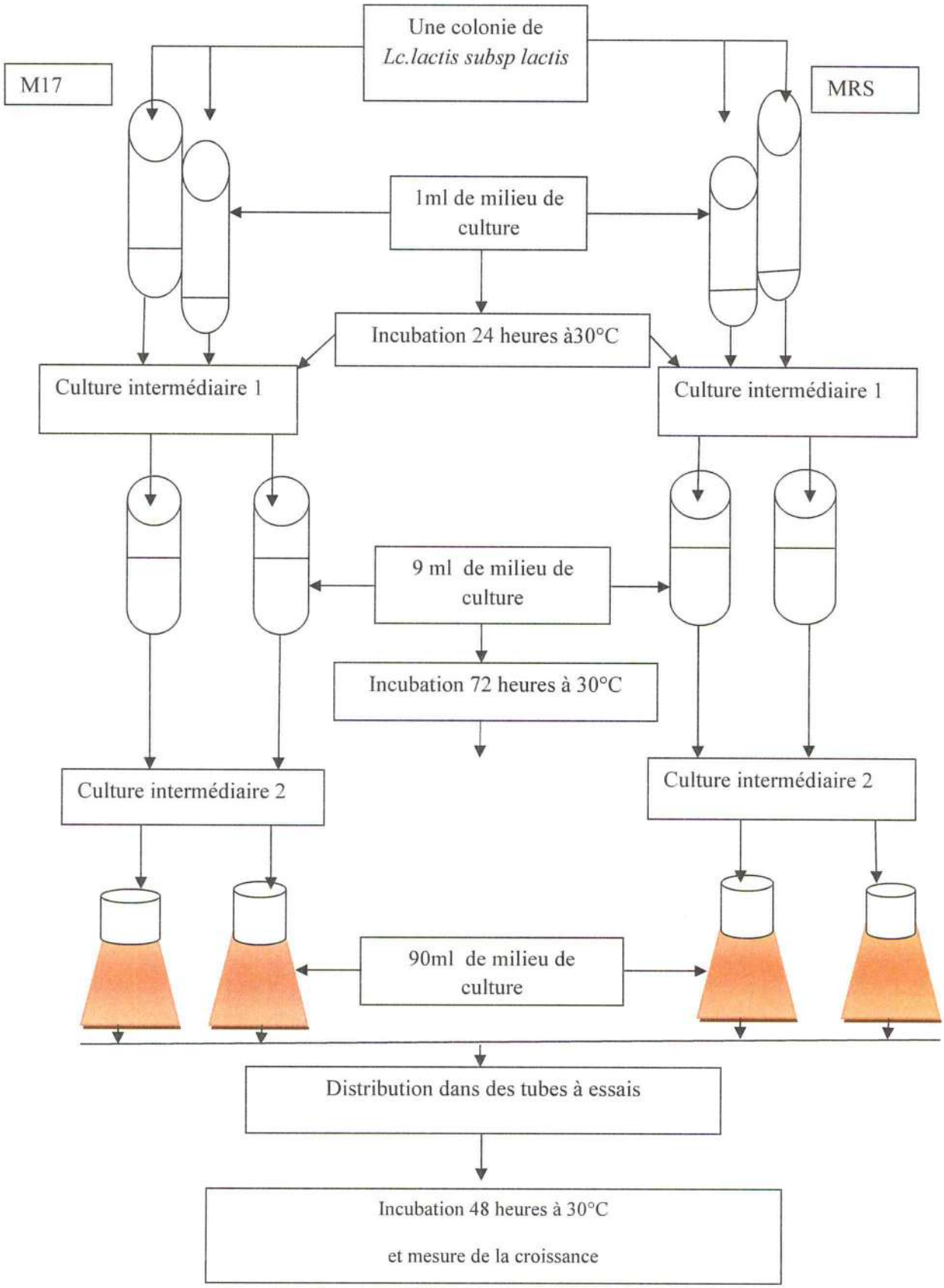

Figure 3 : Préparation des cultures de Lc. et réalisation des courbes de croissance

2.2.5.8.3 Essais d'optimisation des conditions de culture

L'utilisation de ferments, quelque soit les applications envisagées (fermentation, bioconservation), implique de disposer de cultures fraiches, congelées ou lyophilisées contenant un grand nombre de microorganismes viables. D'un point de vue économique, l'idéal est de pouvoir produire un maximum de biomasse en un temps le plus court possible, dans des conditions de culture (milieux notamment) qui ne soient pas trop coûteuses (DENIS et *al.*, 2013).

Un des critères de sélection des ferments porte donc sur leur aptitude à la production d'une substance d'intérêt (DENIS et *al.*, 2013).

Afin d'obtenir une biomasse importante destinée à la production de nisine, nous avons réalisé des essais d'optimisation des conditions de culture des souches de lactocoques préalablement isolées , purifiées et pré-identifiées. Pour ce faire, nous avons procédé dans la présente étude à des essais de supplémentation de chacun des deux milieux de culture M17 et MRS par du glucose et du fructose à différents taux d'incorporation (0 ; 0.25 ; 0.5 ;1 ; 1.5 et 2%). Deux durées d'incubation (18 heures ou 24 heures) à 30°C sont testées pour le même but (DALACHE et *al.*, 2012) (tableau III et IV). Ainsi nous obtenons 11 lots expérimentaux de bouillons M17 et 11 lots' de bouillons MRS. Etant donné que nous avons 02 durées d'incubation, nous nous trouvons en présence de 44 bouillons destinés à la culture des lactocoques camelins et 44 pour les lactocoques caprins.

Tableau III: Constitution des lots expérimentaux du milieu M17, destinés à la culture de la souche d'intérêt isolée

Modification du milieu M17	Lot N^0	Taux d'incorporation %	Durée d'incubation
Néant	1	0	18 heures, 24 heures
Addition de glucose	2	0.25	
	3	0.5	
	4	1	
	5	1.5	
	6	2	
Addition de fructose	7	0.25	
	8	0.5	
	9	1	
	10	1.5	
	11	2	

Tableau IV: Constitution des lots expérimentaux du milieu MRS, destinés à la culture de la souche d'intérêt isolée

Modification du milieu MRS	Lot N^0	Taux d'incorporation %	Durée d'incubation
Néant	1'	0	18 heures, 24 heures
Addition de glucose	2'	0.25	
	3'	0.5	
	4'	1	
	5'	1.5	
	6'	2	
Addition de fructose	7'	0.25	
	8'	0.5	
	9'	1	
	10'	1.5	
	11'	2	

2.2. 5.9. Production de labactériocine par les souches isolées

2.2. 5.9.1. Préparation des pré-cultures

Deux pré-cultures correspondants respectivement aux souches de lactocoques camelins et caprins et une culture issue d'une pré-culture de *Lactococcus lactis sub sp lactis* d'origine bovine (témoin) sont réalisées. Pour la production de la bactériocine, nous avons adopté un protocole conforme aux protocoles réalisés par LACHANCE, (2002) ; DOUMANDJI et *al.* (2010) et SIBOUKEUR et *al.* (2012). Il consiste à préparer une pré-culture à partir de la souche purifiée en inoculant une colonie fraiche de lactocoques préalablement isolée et purifiée dans 1ml du bouillon retenu pour la suite des travaux. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, on procède à un deuxième repiquage dans lequel la culture précédente est inoculée dans un tube contenant 9 ml de bouillon. L'incubation a lieu à 30°C sous agitation à 70 rpm durant 18heures (LACHANCE, 2002). Les cultures destinées à la production de la bactériocine sont ensuite ensemencées à raison de 10% dans des milieux de culture préparés conformément aux conditions optimales de culture préalablement déterminées (tableauV).

Tableau V: Constitution des lots expérimentaux de culture des Lc. pour la production de la bactériocines

Lot N°	Nature de la culture	Milieu de culture	Conditions d'incubation
1	LCCM	M17	Incubation 18 heures à 30°C sous agitation 70rpm
2	LCCP	MRS	Incubation 18 heures à 30°C sous agitation 70rpm
3	LCB	M17	Incubation 18 heures à 30°C sous agitation 70rpm

- LCCM lactocoques d'origine cameline
- LCCP lactocoques d'origine caprine
- LCB : lactocoques d'origine bovine

2.2. 5.9 .2. Séparation de la biomasse et récupération des surnageants

Les lots de culture destinée à la production de la bactériocine (type nisine), précédemment décrits (Tableau V) subissent une centrifugation à 8000rpm pendant 10min à

4°C afin d'éliminer les cellules et de récupérer le surnageant susceptible de contenir la substance d'intérêt recherchée (DIOP *et al* . ,2007)

L'activité antibactérienne de la substance contenue dans le surnageant est recherchée à travers les tests d'antagonisme vis-à-vis de la souche cible « *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ».

a/Tests d'antagonisme

La mise en évidence de la présence d'une bactériocine dans le surnageant, passe par des tests de détection de l'activité antimicrobienne de cette molécule. Puisque les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices autres que les bactériocines, nous avons levé l'effet des acides organiques, notamment celui des acides lactique et acétique, par la neutralisation des surnageants à pH 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1N. L'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène susceptible d'être accumulé dans le milieu de culture est levé par la souche cible choisie à cet effet (*Staphylococcus aureus*) pour sa caractéristique biochimique « catalase positive ».

Trois méthodes sont utilisées pour les tests d'antagonisme : la méthode des puits, celle des spots et celle des disques

***Méthodes des puits**

Des boites de Pétri contenant le milieu Mueller-Hilton(MHA) sont ensemencées par inondation avec une souche de *Staphylococcus aureus* ATTCC11778. Des puits de 5 à 6 mm de diamètre sont creusés stérilement dans la gélose de chaque boite. Ces derniers sont remplis avec 50 µl du surnageant à tester. Les boites de pétri sont placé à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne (METLEF et DILMI-BOURAS, 2009 ; ALLOUCHE *et al*.,2010 ; DOUMANDJI *et al.*, 2010). L'incubation a lieu à 30°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des puits.

***Méthode des spots**

Après avoir coulé les boites de pétri avec de la gélose Mueller-Hilton(solidifiées et séchées) on dépose 5µl de surnageant en spots .Les boites sont séchées à l'air ambiant près du bec bunsen pendant environ 30 minutes. La gélose est recouverte d'une gélose semi molle du

même milieu de culture ensemencée avec la souchecible. Les boites sont incubées 24 heures à30 °C (SCHILLINGER et LUCKE, 1989)

***Méthode des disques (diffusion en milieu gélosé)**

La technique des disques consiste à utiliser des disques (de 5mm de diamètre) de papier filtre préalablement stérilisés et imprégnés du surnageant à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose Mueller-Hilton (MHA) uniformément ensemencée avec une suspension de *Staphylococcus aureus*(GUIRAUD ,1998). Les boites sont placées à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne (METLEF et DILMI-BOURAS, 2009 ; ALLOUCHE*et al.*2010 ; DOUMANDJI *et al.* ,2010). On incube à 30°C pendant 24 h. La souche *Staphylococcus aureus* diffuse au sein de la gélose, sauf là où elle rencontre une concentration de bactériocine suffisante pour inhiber sa croissance. On observe alors autour des disques, une zone circulaire indemne de colonies bactériennes (zone d'inhibition).

b/Etude des caractéristiques biochimiques de la substance d'intérêt

Le comportement de la substance vis-à-vis de la souche cible, suite à des traitements physiquesetchimiques (effet des protéases) a fait l'objet de cette partie du travail. Des tests d'antagonisme (méthodes des disques) sont alors réalisés pour revérifier l'activité inhibitricede la molécule d'intérêt susceptible de se trouver dans le surnageant.

*** Effet de la température**

Les surnageants sont soumis à des températures de, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C et 99°C pendant 10 minutes. Un autre échantillon de surnageant est porté au bain marie réglé à 100°C pendant 20 minutes. Pour chacun des tests, un contrôle non traité thermiquement est réalisé (LACHANCE, 2000).

*** Effet du pH**

Les pH des surnageants sont ajustés à des valeur comprise entre 2 et 10 . nous avons incubé les échantillons de surnageant une 1heure à la température ambiante(25°C), nous avons ensuite tester leurs effet antagoniste à l'égard de la souche cible par le test des disques (ALBANO et *al.*2007 in DJADOUNI 2013).

*** Sensibilité de la substance à la pepsine**

La dénaturation de la bactériocine étudiée présente dans les surnageants de culture de Lc. en présence des protéases est étudiée. Pour ce faire, 60 ml de chaque surnageant est incubé à 37°C pendant 1heure en présence de 10 ml d'une solution aqueuse de pepsine à 20mg/ml. Cette protéase sans action sur la bactériocine est utilisée ici à défaut de protéinase Kou αchymotrypsine connues pour leur effet dénaturant de la nisine. Le contrôle négatif est représenté par une solution de pepsine dénaturée par ébullition pendant 40 minutes. Cette protéase ainsi traitée est incubée avec le surnageant dans les mêmes conditions que l'essai. Uncontrôle positif est réalisé avec le surnageant incubé sans pepsine (LACHANCE,2000).

2.2. 5.10 .Essais d'optimisation des conditions de conservation de la souche d'intérêt

Nous nous sommes proposé de rechercher des conditions optimales de conservation de la souche d'intérêt en vue d'une exploitation ultérieure à travers laquelle, nous entreprendrons des essais de bioconservation d'une denrée alimentaire périssable : la viande.

Deux méthodes de conservation sont testées à savoir une congélation à -20°C en présence et en absence de cryoprotecteurs (le DMSO, le saccharose et le glycérol) et une réfrigération (-4°C). Les cellules destinées à la conservation sont prélevées à partir de cultures jeunes (DENIS et PLOY, 2007).

Les conditions permettant d'obtenir des taux optima de survie des cellules dans le milieu de conservation que ce soit en la présence ou en l'absence d'un cryoprotecteur, seront retenues pour la suite de l'étude. A cet effet, nous avons calculé les taux de survie des cellules pour chaque type de conservation.

2.2. 5. 10.1. Préparation et conservation des cultures

Avant de préparer les cultures destinées à la conservation, nous avons procédé à leur propagation selon le protocole adopté par DOUMANDJI *et al.*, 2010 et SIBOUKEUR,2011.

Le milieu de conservation (ANNEXE3) est réparti dans 5 flacons stériles de 250ml pour chacune des deux souches d'origine cameline et caprine. Quatre flacons sont destinés à la congélation sans et avec cryoprotecteurs (glycérol 15%, saccharose 12%, DMSO 5%) et le cinquième est réservé pour la réfrigération. Les milieux sont inoculés par la souche de Lc.

à raison de 10%. Le contenu de chaque flacon de 250 ml est réparti dans 20 tubes de 5ml constituant un lot. Nous avons ainsi obtenus cinq lots de culture de Lc. destinés à conservation (Tableau VI). Le suivi de l'évolution de la concentration cellulaire avant et après conservation est effectué en utilisant des courbes d'étalonnage préalablement établies et en suivant l'évolution du pH du milieu.

2.2. 5 10.2.Réalisation de la courbe d'étalonnage et détermination des concentrations cellulaires

Pour élaborer la courbe d'étalonnage, nous avons réalisé une gamme étalon à partir d'une culture fraiche à 10% de lactocoques et de ses dilutions. Nous avons ensuite mesuré à l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration cellulaire correspondant à chaque dilution. Nous avons mesuré la DO à 600nm pour chacune des dilutions. Une courbe étalon DO=f(dilution) est alors réalisée. Les dilutions (x) sont ensuite traduites en concentration cellulaire par un calcul.

2.2. 5.10. 3. Inoculation des tubes de conservation

Après la mesure de DO et celle du pH à J0 (avant entreposage), les solutions sont réparties dans des tubes en plastiques stérilisés de 5ml munis d'un bouchon hermétique et conservées pendant trois semaines par réfrigération et par congélation avec et sans cryoprotecteurs (tableau VI).

Tableau VI: Constitution des lots de cultures de Lc. destinés à la conservation

Lot N°	Traitement de conservation	Quantités
1	Réfrigération	40 tubes de 5ml
2	Congélation sans cryoprotecteur	40 tubes de 5ml
3	Congélation + glycérol 15%	40 tubes de 5ml
4	Congélation + saccharose 12%	40tubes de 5ml
5	Congélation + DMSO 5%	40 tubes de 5ml

2.2. 5.10.4. Mesure de la concentration cellulaire des cultures de Lc. après conservation

Les suspensions congelées subissent une décongélation à la température ambiante (37°C environ). Les suspensions réfrigérées et décongelées sont homogénéisées

manuellement et la mesure du pH et la DO sont immédiatement enregistrées. Le calcul des taux de survie des cellules indiquera les conditions optimales de conservation de la souche d'intérêt.

2.2. 5.11 Utilisation des souches d'intérêt isolées dans la bioconservation des viandes

Les deux types de viande (cameline et de poulet) sont traités en utilisant les surnageants issus de cultures de lactocoques camelins, caprins et bovin. Les surnageants bovins sont utilisés à titre comparatif. Parallèlement des essais de conservation faisant appel à l'utilisation directe des souches de lactocoques isolées à partir des laits, camelin, caprin et bovin sont réalisés (la bactériocine produite *in situ*) sont réalisés. Le choix de ces deux types de produits carnés se justifie essentiellement par leur large consommation locale ; la viande cameline fait partie des habitudes alimentaires de la population autochtone. En plus de cela, elle fait actuellement, l'objet d'un intérêt particulier de la part du consommateur algérien du fait de sa nature hypocholestérolémiante et sa qualité nutritionnelle (ABDELHADI et *al.*,2012; MOHAMED et MANAL,2012) . En effet, ce dernier est parfaitement conscient des problèmes de santé engendrés par la consommation des viandes grasses.

2.2. 5.11.1. Origine de la viande

Des morceaux frais de viande cameline (*Rectus femoris*), et de poulet (escalopes) ont été achetés dans une boucherie de la ville de Ouargla. Transportés aussitôt au laboratoire, leur pH est mesuré selon le protocole adopté par DJENANE *et al* .,(2011) . Trois grammes de produit sont broyés et homogénéisés avec 27ml d'eau distillée pendant 10 sec. à 1300 rpm à l'aide d'un mixeur(Moulinex). Le résultat est la moyenne de trois répétitions.

2.2. 5.11.2.Analyses microbiologiques de la viande

Avant inoculation de la viande par les différents lots de culture des lactocoques et les différents lots de surnageants, les viandes sont préalablement analysées par une détermination quantitative de la charge bactérienne initiale (flore aérobie mésophile totale) et par la recherche d'une éventuelle présence de*Staphyloccocus aureus* et leur dénombrement.

a/ Préparation de la solution mère et de ses dilutions

La suspension mère est préparée à partir de 30 g de viande mixés en présence de 90ml d'eau peptonée stérile (V04-501). L'homogénéisation s'effectue à l'aide d'un broyeur électrique à couteaux de type « Virtis ». Cette suspension homogène représente la suspension mère (BENAISSA, 2011).

Les récipients sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium avant d'être réutilisés (CUQ, 2007). A partir de cette suspension mère, nous avons préparé des dilutions décimales.Ainsi, 1ml de la suspension mère introduit dans un tube contenant 9ml d'eau peptonée stérile, permet l'obtention de la dilution 10^{-1}. La dilution 10^{-2} est préparée de la même façon à partir de la dilution 10^{-1}et ainsi de suite pour le reste des dilutions.

b/ Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT)

Un millilitre de la suspension mère (ou d'une dilution décimale) est déposé dans une boite de pétri stérile, à l'aide d'une pipette graduée stérile. Quinze ml de milieu PCArefroidit à 45°C, sont coulés dans chaque boite de Pétri. L'inoculum est soigneusement mélangé au milieu de culture par des mouvements circulaires et de « va-et-vient » ou en forme de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification, les boites sont retournées et incubées à 30°C pendant 72h (GUIRAUD,2012). Le comptage de colonies est effectué à l'aide d'un compteur de colonies (NF V 08-011N et NF V 08-51).

c/Lecture et interprétation

Selon la norme Française XPV08-102, chaque boite retenue devra contenir au plus 300 colonies et au moins 15 colonies.

Le nombre de micro- organismes par gramme de produit est calculé à partir des boites retenues au niveau de deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante :

$$N= \Sigma \text{ Colonies} / (V (n_1+0.1\ n_2) \times d_1)$$

N : le nombre de micro organismes par gramme de produit
Σ Colonies : la somme des colonies comptées sur les boites retenues
V volume de l'inoculum en ml (1ml)
n_1: le nombre de boites retenues à la première dilution
n_2: le nombre de boites retenues à la deuxième dilution

d_1: le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Le résultat de germes dénombrés à 30°C par g de viande cameline (ou du poulet) est noté par un nombre compris entre 1 et 9.9 multiplié par 10^n où n est la puissance appropriée de 10. Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule. Ils sont donnés en logarithme décimal d'unité formant colonie (LARPENT, 1997 et BENAISSA,2011).

d/Recherche et dénombrement des Staphylocoques

Dans une boite de pétri contenant le milieu sélectif Baird Parker, 0.5ml de la suspension mère ou d'une des dilutions décimales correspondantes sont ensemencés. Une fois l'inoculum étalé à l'aide d'un râteau, la boite est retournée et incubée à 37°C pendant 24 heures (ANONYME 3).Ces analyses sont répétées deux fois pour chaqueinoculum. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonies.

2.2. 5.12. Essais de bioconservation des viandes

Afin de lever l'effet antibactérien potentiel des acides organiques, le pH des cultures de Lc. et celui de leur surnageant est ramené à 6.5 avec NaOH 5N stérilisé.

Douze lots comprenant chacun 03 échantillons de 5g de chaque type de viande sont constitués.Chaque échantillon de produit carné est soigneusement badigeonné à l'aide d'un pinceau neuf, avec l'un des lots de surnageant ou de culture de lactocoques et est aussitôt placé à 4° C pendant sept jours.

Ainsi, un lot expérimental de viande soumis à la bioconservation comprend trois échantillons de viande de 5g de la même origine et soumis au même traitement.

2.2. 5.12. 1. Constitution des lots de viande destinés à la bioconservation

La culture de la souche cible (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) et celle de la souche bactériocinogène protectrice (*Lactococcus lactis subsp lactis*) sont obtenues à partir de cultures jeunes sur gélose. On prélève à cet effet, 3 à 5 colonies bien isolées, de tailles plus ou moins proches que l'on dilue dans 5 ml d'eau physiologique stérile. On agite manuellement pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6ufc/ml, est réalisée à l'aide du spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm en admettant qu'une

DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml (0.5 MAC FARLAND).

L'effet direct exercé par la substance contenue dans le surnageant ou l'effet indirect exercé par la culture de Lc. (production *in situ* de la substance bactéricide)sur des produits destinés à la conservation a permis l'obtention de 12 lots que nous avons numérotés de 1 à 12 (tableau VII).Une seconde série de lots numérotés de 1' à 12'obtenus par inoculation volontaire des produits expérimentaux, par *Staphylococcus aureus (*ATCC25923) a également fait l'objet de cette étude. Ces lots « volontairement contaminés ou surcontaminés» par une souche sélectionnée sont comparésaux lots correspondants de *Staph.*contaminés par des souches sauvages (de 1' à 12') (tableau VIII).

Pour faire face à une insuffisance éventuelle de la quantité de bactériocine contenue dans les surnageants ou celle produite par la souche dans la matrice alimentaire, nous avons procédé à une dilution à 10^{-3} dans de l'eau distillée stérile, de la suspension contenant les Staphylocoques (HELLAL, 2011)

Chaque portion de viande est enveloppée dans un film de papier aluminium. Les 03 échantillons du même lot sont placés dans une barquette en aluminium. L'ensemble des lots est placé dans un plateau et entreposé dans le réfrigérateur.

Tableau VII: Constitution des lotsexpérimentaux de viandes, rouge et blanche traitées par les cultures de Lc. ou par leurs surnageants

Lot N^0	**Nombre d'échantillons**	**Traitement de la viande**
Lot 1	3	VR+ SNCM
Lot 2	3	VR+ SNCP
Lot 3	3	VR+ SNB
Lot 4	3	VR+ LcCM
Lot 5	3	VR+ LcCP
Lot 6	3	VR+ LcB
Lot 7	3	VB+ SNCM
Lot 8	3	VB+ SNCP
Lot 9	3	VB+ SNB
Lot 10	3	VB+ LcCM
Lot 11	3	VB+ LcCP
Lot 12	3	VB+ LcB

VR: viande rouge; VB: viande blanche; SN: surnageant; CM: camelin; CP: caprin; B:référencé(bovin); Lc: lactocoques

Tableau VIII: Constitution des lots expérimentaux de viandes, rouge et blanche surcontaminées par *St.aureus*ATCC25923, traitées par les cultures de Lc. ou par leurs surnageants

Lot N^{0}'	Nombre d'échantillons	Traitement de la viande
Lot 1'	3	VRC+SNCM+ ST
Lot 2'	3	VRC+ SNCP+ ST
Lot 3'	3	VRC+ SNB+ ST
Lot 4'	3	VRC+ LcCM+ ST
Lot 5'	3	VRC+ LcCP+ ST
Lot 6'	3	VRC+ LcB+ ST
Lot 7'	3	VBC+ SNCM+ ST
Lot 8'	3	VBC+ SNCP+ ST
Lot 9'	3	VBC+ SNB + ST
Lot 10'	3	VBC+ LcCM+ ST
Lot 11'	3	VBC+ LcCP+ ST
Lot 12'	3	VBC+ LcB+ ST

VRC: viande rouge surcontaminée ; VBC: viande blanche surcontaminée; SN: surnageant; CM: camelin; CP: caprin; B:référencé(bovin); Lc: lactocoques ; ST: *Staphylococcus aureusATCC25923*

2.2. 5.12. 2. Recherche et dénombrement des souches de *Staphylococcus aureus* durant la réfrigération des lots expérimentaux de viande

A j_0 (avant entreposage), j_0+1, j_0+2 et j_0+6 (deuxième, troisième et septième jour de réfrigération), un échantillon de chacun des lots non contaminés (et des lots' contaminés) est prélevés au hasard placé individuellement dans une fiole de 250ml stérilisée contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée stérile à 0.1 % (V04-501). L'ensemble est homogénéisé à la température ambiante pendant 1 minute .Un millilitre de la suspension mèreainsi obtenue est introduit dans un tube contenant 9ml d'eau peptonée stérile (dilution 10^{-1}). Des dilutions décimales sont préparées pour réaliser la numération des staphylocoques. L'ensemencement (volume de l'inoculum)est donc effectué sur le milieu sélectif Baird-Parker. L'incubation a lieu à 37°C entre 24 et 48h. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonie. Les résultats sont exprimés en logarithme décimal ufc/g (, (LARPENT, 1997 et DJANANE et *al.*, 2012).

2.2. 5.13. Analyses statistiques

Dans le but de comparer les résultats obtenus dans les parties relatives aux essais d'optimisation des conditions de culture des lactocoques, aux essais d'optimisation des conditions de conservation de ces derniers et la bioconservation de la viande cameline et du poulet, nous avons utilisé deux tests statistiques :le test KRUSKAL-WALLIS CHI-SQUAREDE et le test WELXOCON.

Partie III.

Résultats et discussion

III-Résultats et discussion

3.1. Tests préliminaires

Les valeurs du pH et de l'acidité titrable des échantillons de lait analysés sont reportées dans les tableaux IX et X

Tableau IX: pH et acidité Dornic des échantillons de lait camelin

Echantillon	pH	Acidité Dornic (°D)
1	6,6	19
2	6,4	20
3	6,7	17
Moyenne	**6.56±.0.15**	**18.66±1.52**

Tableau X: pH et acidité Dornic des échantillons de lait caprin

Echantillon	pH	Acidité Dornic (°D)
1	6,79	15 .33
2	6,8	15
3	6,82	15.3
4	6.7	16
5	6.88	15.9
Moyenne	6.77±0.06	15.43±0.51

Les pH de lait des deux espèces sont comparables .Ils témoignent de leur état de fraicheur.

Les valeurs du pH du lait camelin sont comparables à celles rapportées par les travaux consultés dans la bibliographie.En effet HASSAN(1987) rapportent des valeurs comprises entre 6 .60 et 6.97). KAMOUN(1995), signale une valeur du pH égale à 6.51 ±0.12.Ces valeurs sont proches également de celles trouvées par ABU TARBOUCH *et al.*,(1998)(6.49±0.024),SMAIL(2002)(6.24±0.48), KHASKHELI et *al* .,(2005)(6 .77 ±0.07),SIBOUKEUR (2007) (6,31± 0,15.), SBAOUI et*al.* (2009)(6.41 0.18), MAHBOUB(2010) (6.65±0.132) , MEDJOUR (2014)(6.49) et SIBOUKEUR (2011)(6 ,65).

Concernant les valeurs du pH du lait caprin, celles-ci sont proches des valeurs signalées par MOUALEK(2009)(6.58 à6.65). Elles se situent dans la fourchette des valeurs trouvées par(REMEUF et *al.*,1989) (6.45 à6.90 avec une moyenne de 6.7)

L'acidité Dornic des échantillons camelins est toutefois plus importante que celle du lait caprin. Une telle acidité Dornic est susceptible d'abaisser le pH considérablement. Ce n'est pas le cas du lait camelin qui possède un effet tampon relativement important par rapport au lait des autres espèces. Cette particularité est rapportée par de nombreux auteurs (ABU- TARBUSCH (1996) ;SIBOUKEUR 2007).

Les valeurs de l'acidité titrable des échantillons de ce lait est comparable à celles rapportées par SBOUI *et al.*, (2009) en Tunisie soit (17,2 °D±1.03) et SIBOUKEUR (2007) en Algérie (soit 18.2°D ±2.93).Cette même valeur est toutefois différente de celles rapportées par SAWAYA *et al.*,(1989) ; MEHAIA, (1993) .

La valeur de l'acidité dornic des échantillons du lait de chèvre est proche de celle trouvée par MOUELEK, (2009)(de14.7 à 16.5°D)

Les valeurs du pH et de l'acidité titrable des échantillons analysés indiquent que ces derniers sont de bonne qualité microbiologique. Cette constatation expérimentale est corroborée par le temps mis pour la décoloration du bleu de méthylène (> à 5 heures). La charge microbienne peut être estimée selon LARPENT, (1997) à 100000 à 200000 germes/ml.

3.2. Isolement des lactocoques sur milieu M17

L'ensemencement du lait des deux espèces dans le milieu spécifique M17 a permis le développement de 02 colonies pratiquement identiques mais de taillesensiblement différente (Photos 1 et 2).

3.3. Examen macroscopique

L'examen macroscopique a fait ressortir la description résumée dans le tableau XIet XII.

Photo 1 : Colonies de lactocoques isolées à partir du lait camelin, sur milieu M17

Photo 2: Colonies de lactocoques isolées à partir du lait caprin, sur milieu M17

Tableau XI: Examen macroscopique des colonies isolées à partir de lait camelin

	Colonie 1	**Colonie 2**
Taille	2mm	0,5 à 1mm
Forme	Ronde bombée	Ronde bombée
Aspect de surface	Lisse /brillante	Lisse /brillante
Couleur	Blanchâtre	Blanchâtre
Consistance	Crémeuse	Crémeuse
Opacité	Opaque	Opaque

Tableau XII : Examen macroscopique des colonies isolées à partir de lait caprin

	Colonie 1	Colonie 2
Taille	2mm	0,5 à 1mm
Forme	Ronde bombée à contour lisse	Ronde bombée à contour lisse
Aspect de surface	Lisse /brillante	Lisse :brillante
Couleur	Crème	crème
Consistance	Crémeuse	Crémeuse
Opacité	Opaque	Opaque

Le test de la catalase réalisé sur les souches caprines et camelines,indique la présenced'effervescenceavec les colonies de 2mm(colonies 1) et son absence avec les colonies 2. De ce fait, nous n'avons retenus que les colonies 2 puisque les souches auxquelles nous nous intéressons doivent être à catalase négative.

Ces résultats concordent avec la description de DELLAGLIO et *al.*, (1994),relative aux lactocoques. Selon l'auteur, ce caractère(catalase négative) indique l'appartenance des bactéries lactiques au genre Lactococcus.

3.4. Examen microscopique

L'examen microscopique des colonies isolées retenues, consiste en leur observation à l'état frais et après coloration de GRAM des cellules.

3.4.1. Examen à l'état frais

Les deux souches isolées se présentent sous forme de coques immobiles. Ce résultat concorde avec le caractère des bactéries lactiques décrit par DELLAGLIO et *al.*1994.

3.4.2. Examen après coloration de GRAM

La coloration de GRAM des cellules indique que les souches étudiées sont àGRAM+. Certaines sont en monocoques, d'autres regroupées en diplocoques ou en chainettes (photos 3 et 4).

Les observations macroscopiques et microscopiques sont complétées par des testsphysico-chimiques et biochimiquesdans le but d'une pré-identification des souches bactériennes isolées.

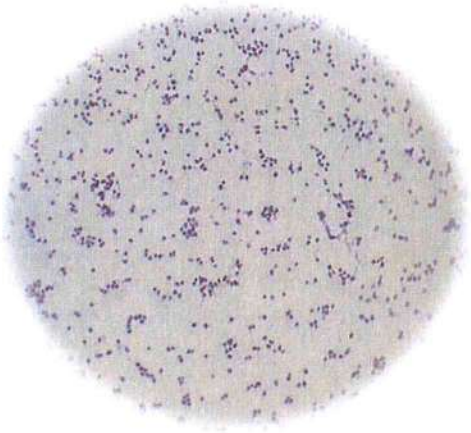

Photo 3 : Souche de lactocoques isolée à partir du lait camelin après coloration de GRAM. (Grossissement 1000)

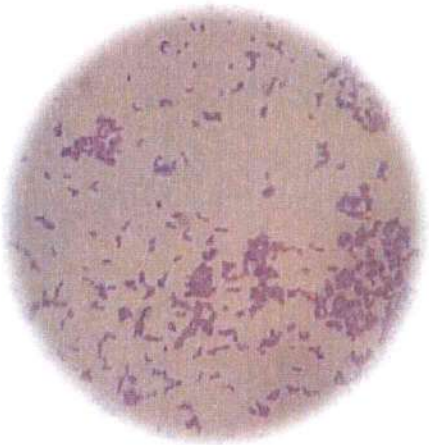

Photo 4: Souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin après coloration de GRAM. (Grossissement 1000)

3.4.3. Caractérisation physico-chimique et biochimiquedes cellules

Les résultats des tests physico-chimiques et biochimiques effectués sur les souches isolées à partir du lait des deux espèces sont présentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Caractéristiques physico-chimique et biochimique des souches

Tests	Souches camelines	Souches caprines
Type fermentaire	Homofermentaire	Homofermentaire
Croissance à 10°C	+	+
Croissance à 40°C	+	+
Croissance à 45°C	-	-
Tolérance à 2% de NaCl	+	+
Tolérance à 4% de NaCl	+	+
Tolérance à 6.5% de NaCl	-	-
Tolérance au pH 9.2	+	+
Tolérance au pH 9.6	-	-
Culture sur lait au bleu de Sherman	+	+
Hydrolyse de l'arginine	+	+
Utilisation du Citrate	+	+
Fermentation du Man	-	-
Fermentation de l'Ino	-	-
Fermentation du Sor	-	-
Fermentation du Rha	-	-
Fermentation du Sac	-	-
Fermentation du Mel	-	-
Fermentation de l'Amy	-	-
Fermentation de l'Ara	-	-

On constate que les souches issues du lait de chamelle et celles issues du lait de chèvreprésentent les même propriétés physico-chimiques et biochimiques.

D'après ce tableau, les souches isolées présentent un métabolisme homofermentaire(absence de production de CO_2 dans la cloche de Durham).Elles ne poussent pas en présence de 6,5 % de NaCl mais croissent à desconcentrations comprises entre 2 et 4 % de ce sel. Les deux souches ne présentent pas une croissance à pH 9.6 et présentent une croissance à pH9.2.Selon DELLAGLIO et *al.*, (1994) l'inaptitude de croissance à 6.5% de NaCl constitue une des

caractéristiquesde l'espèce*Lactococcus lactis.*Selon le même auteur,l'inaptitude à la croissance à pH 9.6 permet de distinguer l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* des espèces *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*biovar. *diacetylactis* .

Les deux souches isolées peuvent croitre à des températures comprises entre 10°C et 40°C etsont incapables de se multiplier à 45°C.Elles hydrolysent l'arginine et ne fermentent pas les sucres suivants : Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy et Ara.En plus de cela, elles se multiplient dans du lait au bleu de Sherham (réaction positive :coagulation, décoloration et acidification).

De tout ce qui précède, il semblerait que les deux souches isolées appartiennent à l'espèce*Lactococcus lactis.* L'inaptitude à croitre à pH 9.6 et l'incapacité de fermenter les sucres,sont de nature àsuggérer qu'il s'agit de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* car selonGUIRAUD,(1998),*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est la seule souche de lactocoques parrapport *à Lactococcus lactis* subsp. *cremoris et Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* qui ne se développe pas à pH9.6.

3.5. Optimisation des conditions de culture des souches cameline et caprine isolées

Afin d'optimiser les conditions de culture des deux souches de lactocoques , nous avons réalisé deux courbes de croissance en utilisant deux milieux de culture, le milieu sélectif M17 habituellement utilisé pour les Lc. et le milieu MRSsusceptible de donner une croissance aussi bonne pour les lactocoques selon SCHARMA,(2007).

3.5.1. Souche de lactocoques camelins

3.5.1.1. Culture de la souche sur milieu M17 et courbe de croissance

Une courbe de croissance de la souche est réalisée sur la base d'une courbe étalon pré établie (Figure 4). La concentration cellulaire de la culture est déterminée par la mesure de la DO à600 nm àdifférents moment de l'incubation(Figure5).

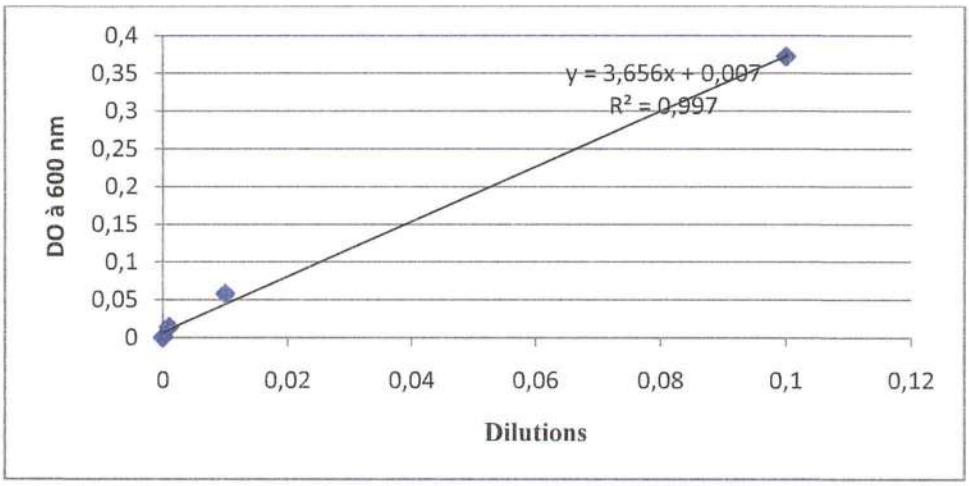

Figure 4 : Courbe d'étalonnage DO f(dilutions) dans le bouillon M17

A partir de l'équation Y= 3,656 × + 0,007, nous avons procédé à la détermination de concentration cellulaire inconnue puis au traçage de la courbe de croissance (fig.4).

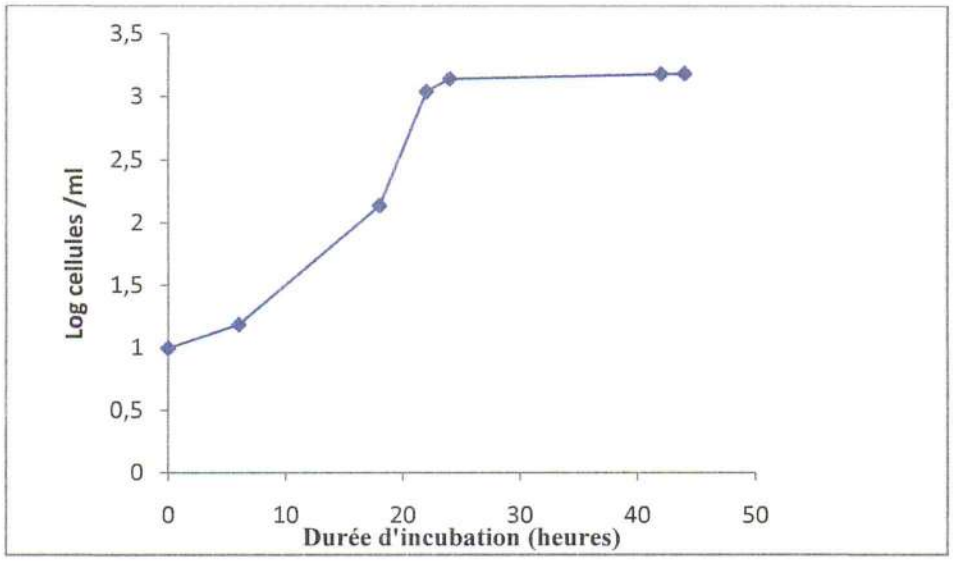

Figure 5: Courbe de croissance d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait camelin sur milieu M17

3.5.1.2. Culture de la souche sur milieu MRS et courbe de croissance

Une courbe de croissance de la souche cultivée sur milieu MRS, est réalisée sur la base d'une courbe étalon préalablement établie (Figure 6). La mesure de la DO à600nm (BEAL et *al* ,2008) permet donc de déterminer la concentration cellulaire de la culture à tout moment de l'incubation (Figure7).

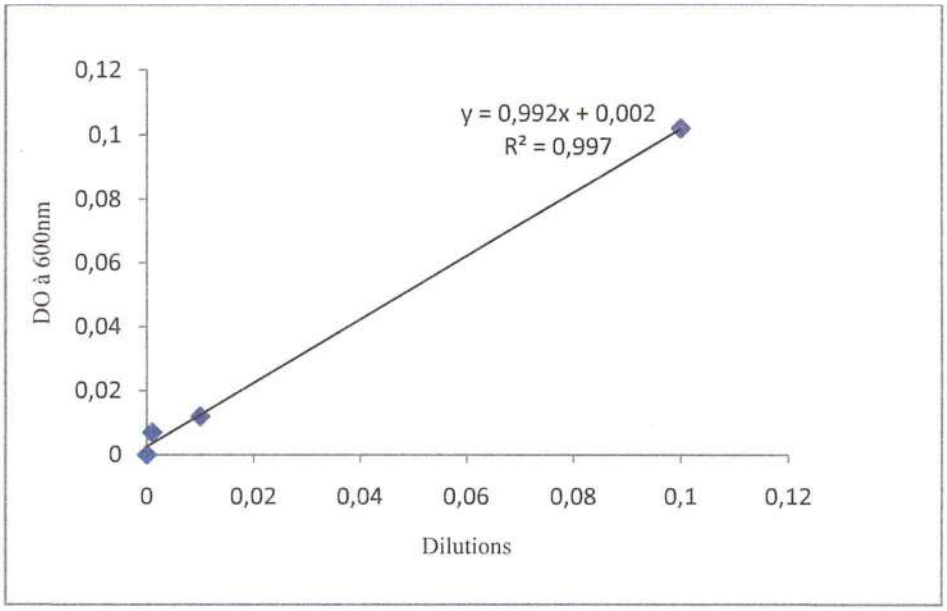

Figure 6 : Courbe d'étalonnage DO en fonction de la concentration cellulaire sur milieu MRS

A partir de l'équation Y= 0,992 × + 0,002, on calcule la concentration cellulaire et on obtient la courbe de croissance illustrée par la figure 6.

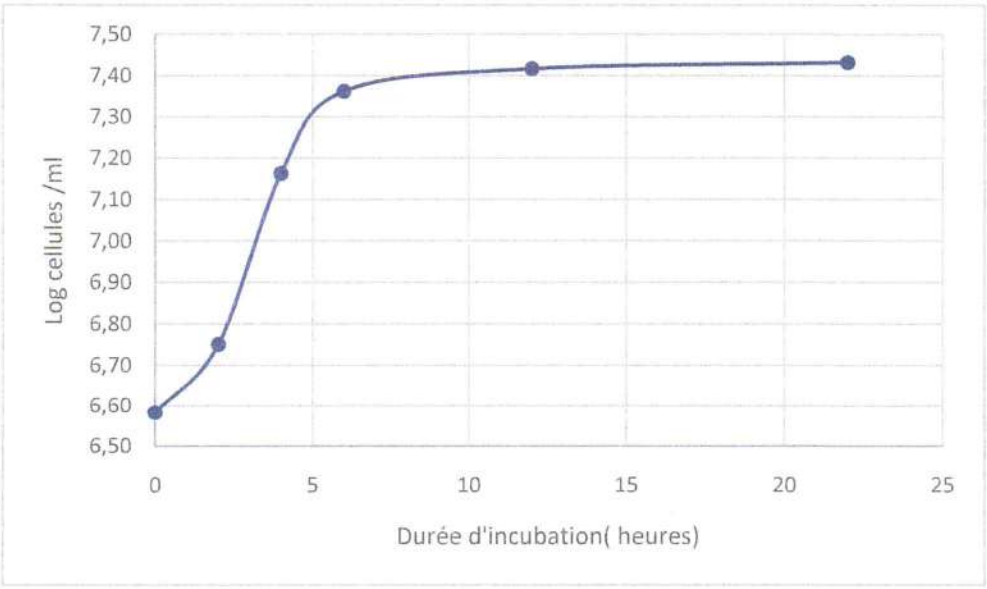

Figure 7: Courbe de croissance d'une souche de Lactocoques isolée à partir du lait camelin sur milieu MRS

Les deux courbes répondent à la courbe classique de croissance des bactéries. La phase exponentielle de croissance est atteinte plustôt en milieu MRS.La phase de stationnaire est atteinte beaucoup plus tôt avec le milieu MRS 7 heures d'incubation versus 24 heures avec le

milieu M17. En plus de cela, dans le milieu MRS, la phase exponentielle est plus courte que dans lemilieuM17(5heures dans le milieu MRS versus 17 heures dans le milieu M17). Ce résultat nous confirme que pour utiliser des souches à la fin de la phase exponentielle, il est préférable d'utiliser le Milieu M17 pour la culture des Lc camelins car ce milieu nous donne plus de temps et de chance pour prélever des souchesfraiches.

3.5.2. Souche de lactocoques caprins

3.5.2. 1. Culture de la souche sur milieu M17 et courbe de croissance

De la même manière que pour les Lc. camelins, une courbe de croissance de la souche caprine est réalisée .La courbe étalon pré établie est présentée dans la figure 8. La concentration cellulaire de la culture est déterminée par la mesure de la DO à600 nm à différents moments de l'incubation (Figure 9).

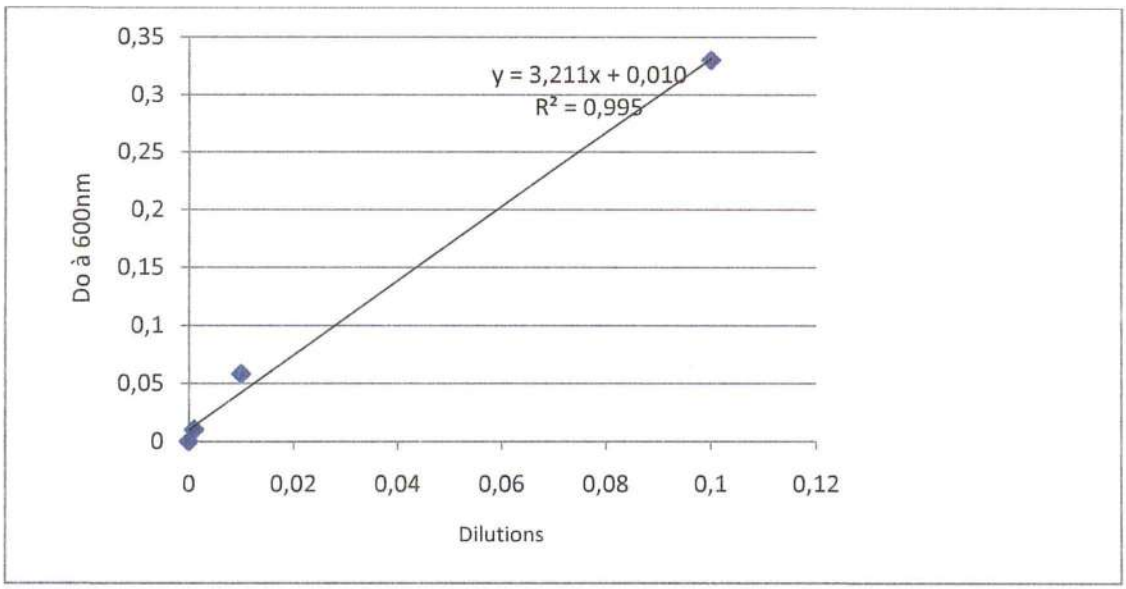

Figure 8: Courbe d'étalonnage DO f(dilutions)

A partir de l'équation Y=3.211x + 0.010 on a calculé le X qui représente la concentration cellulaire dans bouillon M17. A partir de ces concentrations, nous avons a tracé la courbe de croissance illustrée par la figure9.

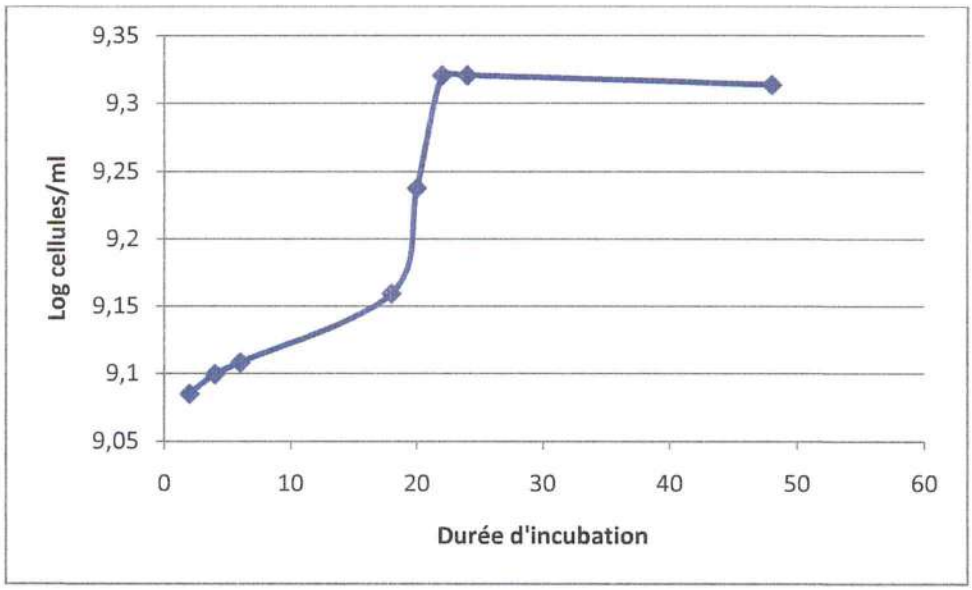

Figure 9: Courbe de croissance d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin sur milieu M17

3.5.2.2. Culture de la souche sur milieu MRS et courbe de croissance

Une courbe de croissance de la souche cultivée sur milieu MRS, est réalisée sur la base d'une courbe étalon préalablement établie (Figure10). La mesure de la DO à600nm (BEAL et *al.*, 2008) permet donc de déterminer la concentration cellulaire de la culture à tout moment de l'incubation (Figure11).

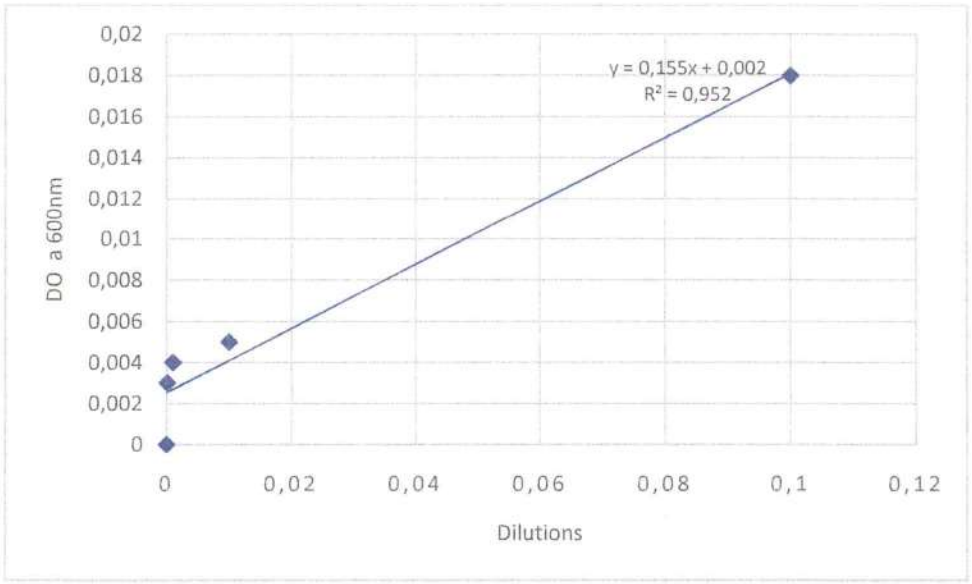

Figure 10:Courbe d'étalonnage de la souche Lactocoques ensemencé dans un milieu MRS.

A partir de l'équation Y= 0.0025x + 0.1556 on a calculé le X qui représente la concentration cellulaire en bouillon et MRS respectivement et on a tracé la courbe de croissance illustrée par la (figure 11)

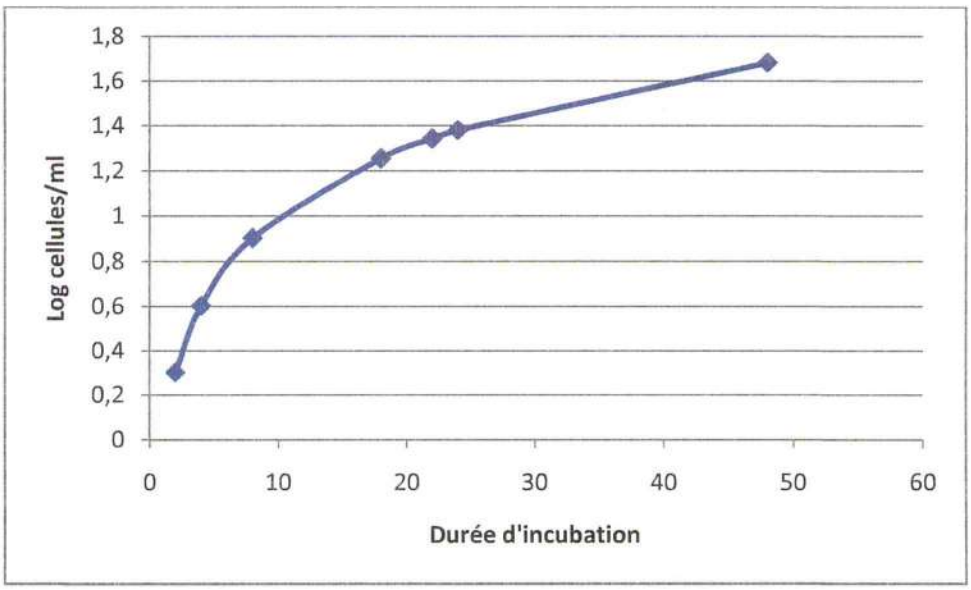

Figure 11: Courbe de croissance d'une souche de Lactocoques isolée à partir du lait caprin sur milieu MRS

La croissance de la souche lactococcique sur le milieu M17 atteint la phase exponentielle après 18 heures d'incubation environ (figure 9). Avec le MRS, cette phase est atteinteaprès 2 heures seulement d'incubation (figure 11). En milieu M17, la croissance des lactocoques caprins passe donc par une durée de latence relativement plus longue. La croissance rapide de la souche en milieu MRS est probablementdueàla composition de ce dernier, notamment à sa source de carbone.

3.6. Essais d'optimisation des conditions de culture des deux souches d'intérêt isolées

Les essais d'optimisation des conditions de culture des souches de lactocoques préalablement isolées, purifiées et pré-identifiées sont réalisés dans le but d'obtenir une biomasse importante destinée à la production de la substance bactéricide.

3.6.1. Essais d'optimisation des conditions de culture des souches isolées

L'addition de fructose ou de glucose à des taux de 0.25, 0.5, 1, 1.5 et 2 % variables ont conduit aux résultats illustrés par les figures 12, 13, 14, 15 ,16 ,17, 18 et 19.

3.6.1.1. Culture de la souche cameline sur M17

Pour une période d'incubation de 18 heures, la concentration cellulaire la plus élevée est obtenue avec 0,25% de glucose ($4,21x10^5$cellules/ml) ou 1% de fructose avec une concentration cellulaire sensiblement comparable. Par rapport au témoin qui présente une concentration cellulaire égale à 4,13 $x10^5$cellules/ml, ces concentrations semblent légèrement plus élevées (Figure 12).

Pour 24 heures d'incubation, les meilleures concentrations cellulaires à savoir $4,23x10^5$cellules/ml, $4,22x10^5$cellules/ml, $4,23x10^5$cellules/ml sont obtenues respectivement avec 0 ,25% ; 0,5%; et 1,5%de glucose. Par rapport au témoin qui présente une concentration cellulaire égale à $4,23x10^5$ cellules/ml, ces concentrations cellulaires lui sont comparables (Figure 12).

La croissance cellulaire la plus élevée qui peut aller jusqu'à $4,26x10^5$ cellules/ml avec 1% de fructose est obtenue quelque soit le taux de fructose additionné.

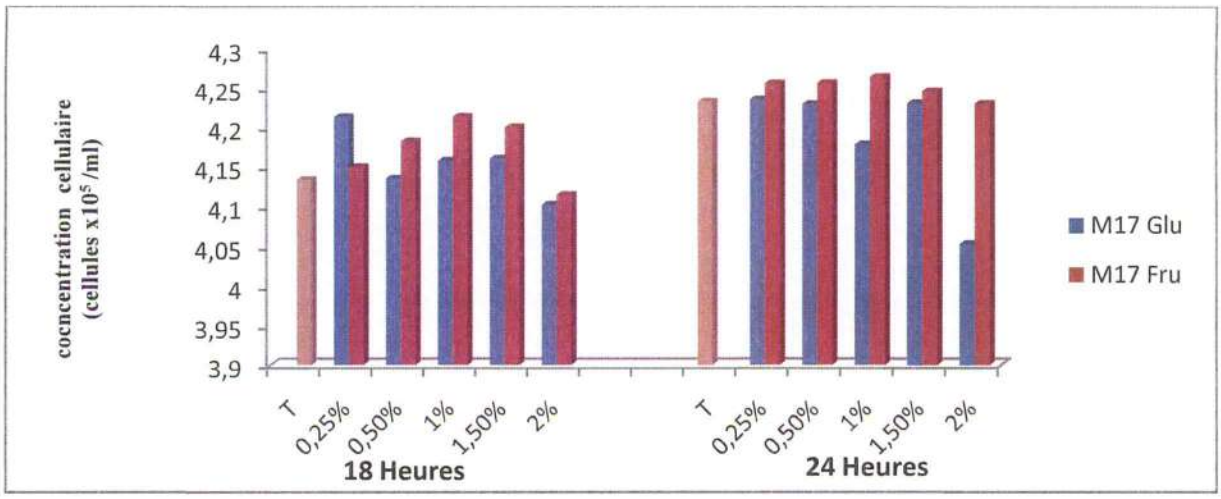

Figure 12: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelines isolée sur milieu M17 en fonction de concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18 h et 24

Le pH diminue quelque soit la nature de l'ose ajouté au milieu et quelque soit le temps d'incubation. Ce résultat conforte ceux relatifs à la concentration cellulaire. Il indique en effet, la présence d'une activité homofermentaire responsable de la diminution du pH. Cette diminution est comparable pour tous les essais (Figure 13).

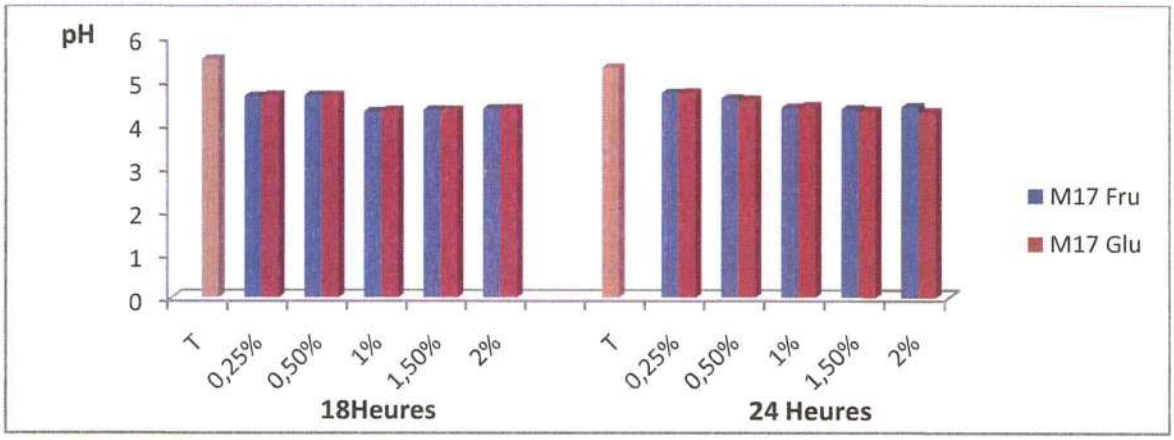

Figure 13: Evolution du pH de la souche de Lactocoques camelins,isoléesur milieuM17à différents concentration en fructose et glucose

3.6.1.2. Culture de la souche cameline sur MRS

Pour une période d'incubation de 18 heures, on remarque que la meilleure concentration cellulaire est obtenue avec 1,5% de glucose ($3,47x10^5$cellules/ml versus $3,38x10^5$cellules/ml pour le témoin). Pour le milieu MRS supplémenté avec du fructose, toutes les concentrations cellulaires obtenues sont inférieures à celle du témoin.

Pour une période d'incubation de 24 heures, une bonne concentration cellulaire est obtenue quelque soit le sucre ajouté au milieu de culture. Ces concentrations sont soit légèrement plus élevées, soit égales à celle du témoin égale à $3,42x10^5$cellules/ml (Figure 14). Toutefois, l'addition de 0.5% de fructose au MRS, enregistre une concentration plus élevée soit $3.48\ x10^5$cellules/ml.

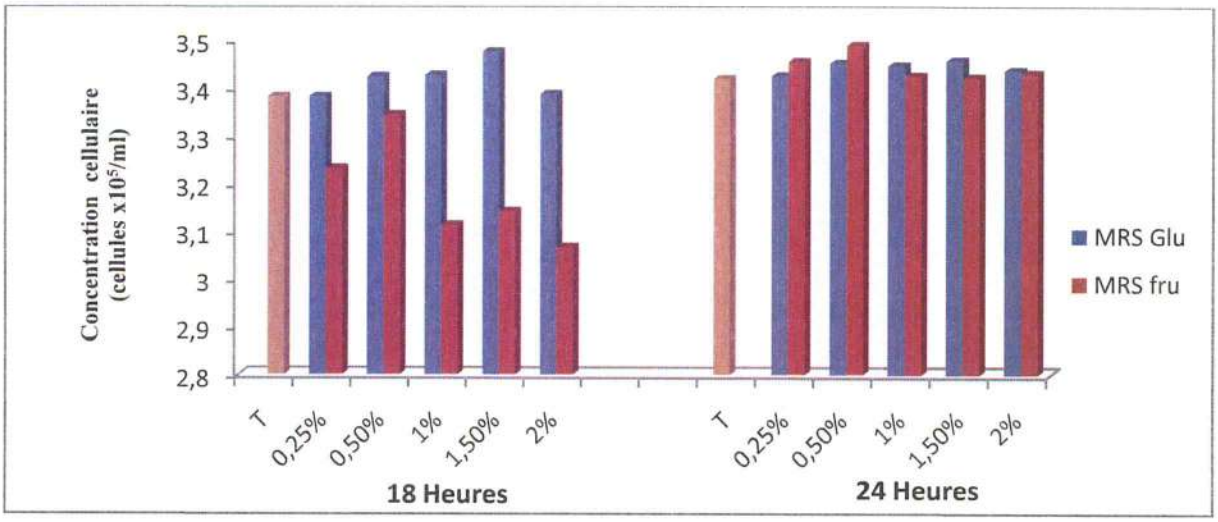

Figure 14: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques camelins, isolée sur milieu MRS en fonction de concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18 h et de 24h

Concernant le pH du milieu ensemencé, on remarque une diminution de ce dernier dans tous les cas de figure (Figure 15). Cela indique la présence d'une activité métabolique dans le milieu de culture.

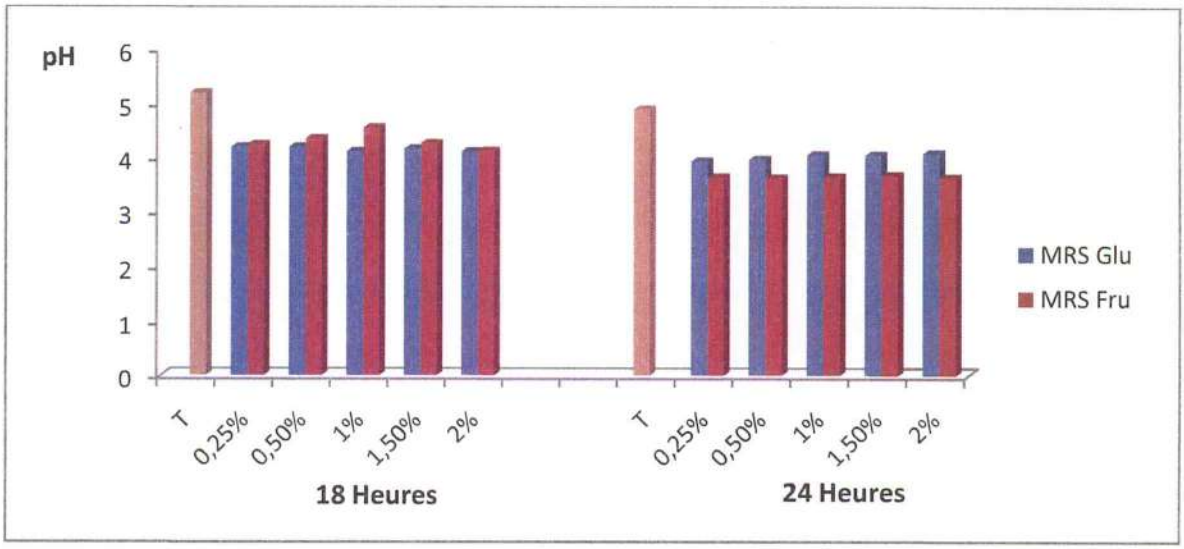

Figure 15: Evolution du pH de lactocoques isolés sur milieu MRS à différentes concentrations en fructose et en glucose pendant une période d'incubation de 18 h et de 24h

3.6.2. Essais d'optimisation des conditions de culture de la souche caprine

3.6.2.1. Culture de la souche caprine sur M17

Pour une période d'incubation de 18h, une augmentation de la concentration cellulaire est observée dans le milieu de culture quelque soit la concentration en sucres par rapport au témoin ($3.73x10^5$cellules/ml) .Une meilleure concentration cellulaire est obtenue avec 1% de glucose($3.86x10^5$cellules/ml)ou avec 0.25 et1% de fructose ($3.88x10^5$cellules/ml)(figure16) .

Pour une période d'incubation 24h une augmentation importante de la biomasse cellulaire est observée rapport au témoin ($3.73x10^5$cellules/ml) quelque soit le taux de sucres ajouté au milieu de culture. Une meilleure croissance est obtenue avec 0 .25% et 1% ($3.91x10^5$, $3.90x10^5$ cellules/ml respectivement)de glucose ou de 0.25 ,1 et 2% de fructose($3.92x10^5$, $3.91x10^5$, $3.90x10^5$ cellules/ml respectivement) (figure16).

Concernant l'évolution du pH, la figure 17indique une diminution de ce paramètre dans tous les cas de figure par rapport a témoin ($4.86x10^5$cellules/ml).

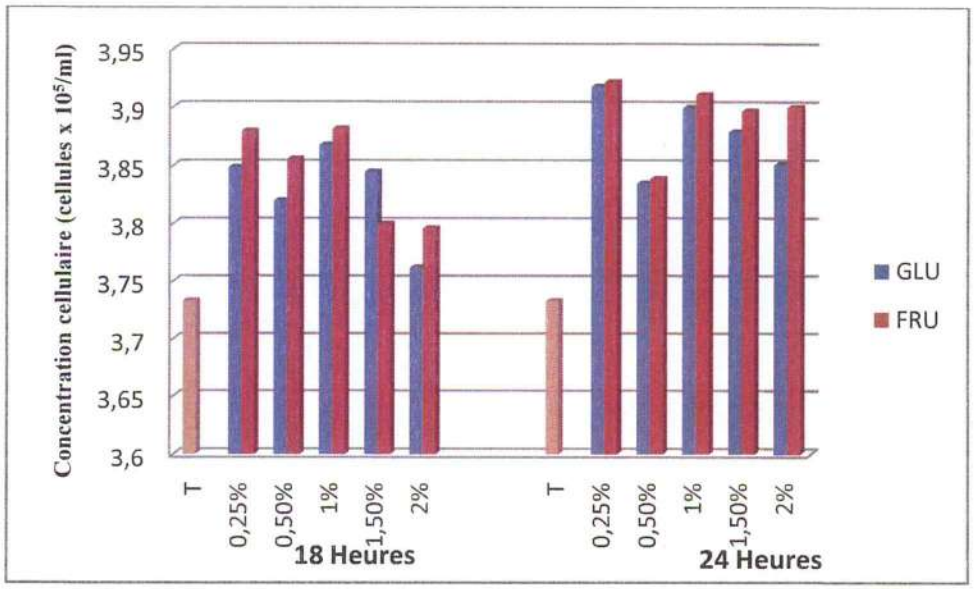

Figure 16: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques isolée sur milieu M17 en fonction de la concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18h et de 24h.

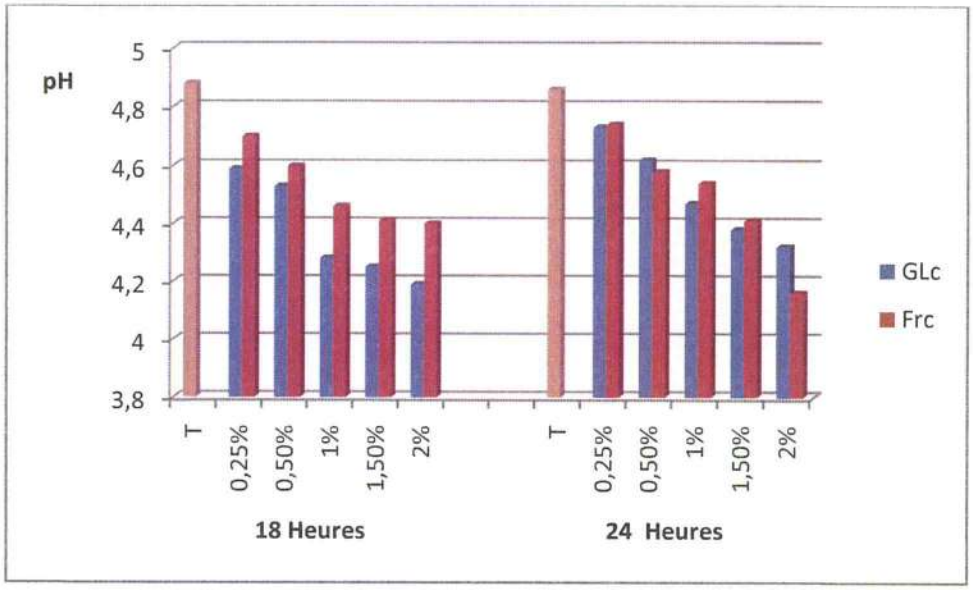

Figure 17: Evolution du pH de la souche de Lactocoques isolée sur milieu M17 à différentes concentrations en fructose et glucose pendant une période d'incubation de 18 h et de 24h

3.6.2.2. Culture de la souche caprine sur MRS

Aprés18h d'incubation, une augmentation de la concentration de la souche de Lactocoques est constatée quelque soit la concentration de sucres ajouté au milieu de culture par rapport au témoin qui présente une concentration cellulaire égale à 4.33 $x10^5$cellules/ml .La meilleure concentration cellulaires dans ces lots est obtenue avec 2% du glucose (4.55$x10^5$cellules/ml) ou 1.5 % de fructose (4.47. $x10^5$cellules/ml)(figure18) .

Après 24h d'incubation, on observe une augmentation de la concentration de la souche de Lactocoques par rapport au témoin (4.33$x10^5$cellules/ml) quelque soit la concentration en sucres.La meilleure concentration microbienne(4.55$x10^5$cellules/ml) est obtenue avec 2% de glucose . La même concentration cellulaire (4.45$x10^5$cellules/ml) est obtenue avec 0.25, 0.5, 2.% de fructose (figure18)

Concernant l'évolution du pH, on remarque une diminution de pH dans tous les lots expérimentaux par rapport au témoin(figure19).

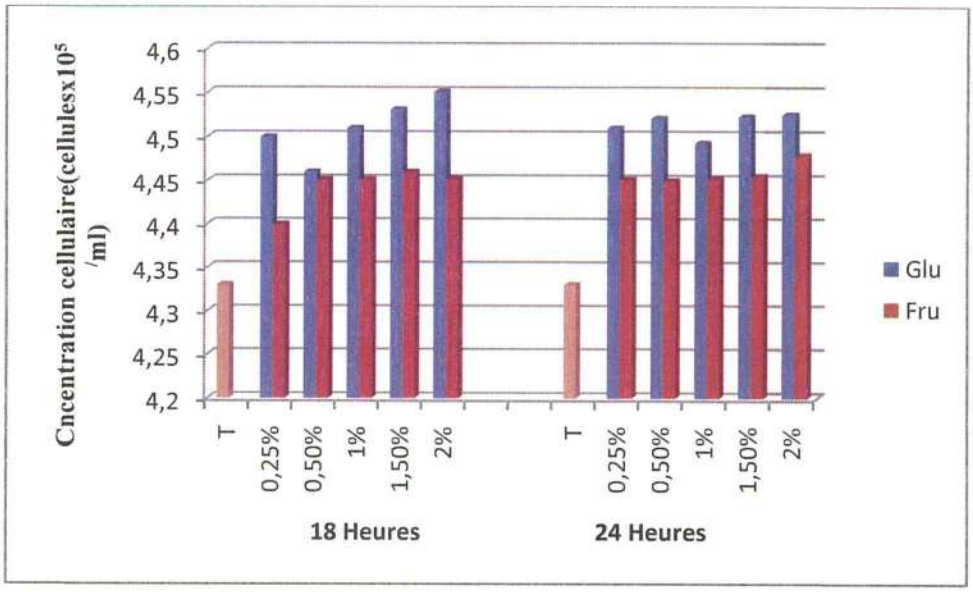

Figure 18:Evolution de la concentration cellulaire de la souche de Lactocoques isolée sur milieu MRS en fonction de la concentration en glucose et en fructose pendant une période d'incubation de 18h et de 24h.

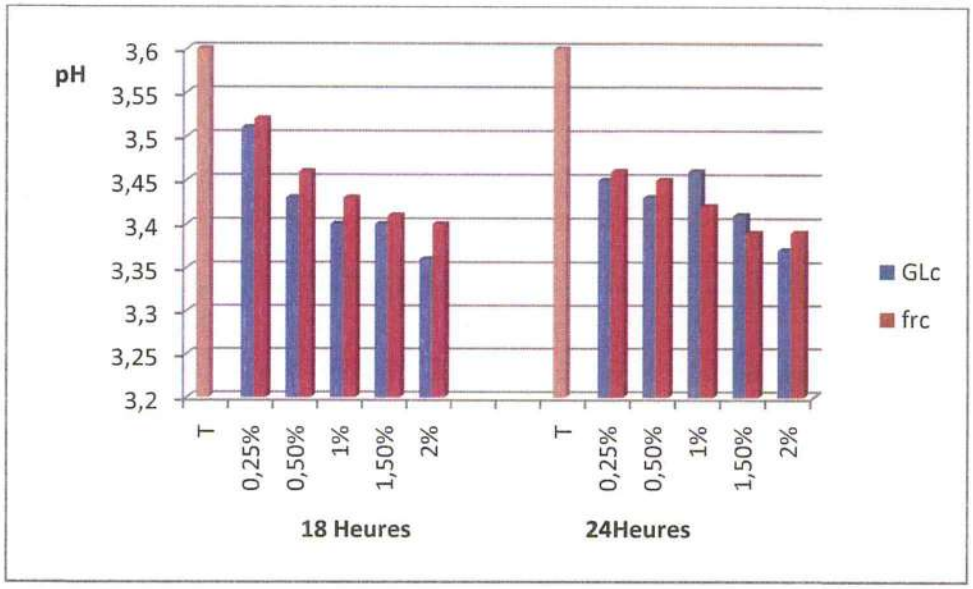

Figure 19: Evolution du pH de la souche de Lactocoques à différents concentration en fructose et glucose pour MRS pendant une période d'incubation de 18 h et de 24h

3.6.3. Etude statistique de l'optimisation des conditions de culture des souches

Les analyses statistiques indiquent une différence très hautement significative entre les deux milieux de culture ensemencés par des lactocoques camelins ($p<0.001$). Cela

confirme nos résultats selon lesquelles le milieu M17 donne des concentrations cellulaires plus élevées que le milieu MRS. Ainsi, ces testsmontrent une différence hautement significative entre les deux duréesd'incubation (18 et 24heures et la concentration cellulaire des Lc. camelins ($p<0.01$).Cela confirme les résultats selon lesquels une période d'incubation de24 heures permet d'obtenir des concentrations cellulaires plus grandes qu'une période d'incubation de 18 heures.Cela est vraisemblablementdû au fait que les cellules sont en fin de phase exponentielle après 24 heures d'incubation selon la courbe de croissance des Lc camelins réalisée au début de cette étude. Les différences entre le type d'ose et sa proportion dans le milieu de culture n'est pas significative ($p>0.05$).

Les analyses statistiques relatives à la culture des souches caprines, montrentunedifférencenon significative ($p>0.05$) entre les proportions et la nature du sucre ajouté dans le milieu M17 et MRS. Cela veut dire que quelque soit le sucre ajouté au milieu de culture et quelque soit sa concentration dans le milieu, la croissance des souches caprines n'augmente pas significativement. En plus de cela l'étude statistique révèle une différence non significative entre les périodes d'incubation et la concentration cellulaire ($p>0.05$). Cependant, la différence de croissance de ces souches dans le milieu MRS et le milieu M17 est très hautement significative ($p<0.001$). L'étude montre que la souche cultivée dans le milieu MRS donne un taux de croissance supérieur au taux de croissance des cellules cultivées dans le milieu M17.Ce résultat est comparable à celui de SHARMA *et al.,* (2010) qui a utilisé un milieu MRS pour la culture et la production d'une bactériocine par *Lc.lactis CCSU LAC1* .Ce résultat peut être expliqué par le fait que la phase exponentielle des Lc. caprins est atteinte plus tôt dans le milieu MRS que dans le milieu M17 (2heures versus 18 heures) selon les courbes de croissance établies préalablement.Selon SHARMA *et al.*,(2010), le glucose, la peptone, l'extrait de levure et l'hydrogénophosphate de potassium sont des facteurs favorables pour la croissance des lactocoques caprins.Selon DORTUS et THONART,(2008),les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance. Des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires.

3.7. Production de bactériocine

Conformément aux résultats obtenus lors des essais précédemment effectués,nous avons réalisé la suite de nos travaux en utilisant le milieu M17 pendant une période d'incubation de 24heures pour les cultures des Lc. camelins.Les Lc. caprins sont cultivés dans le milieu MRS pendant 18 heures d'incubation.

3.7.1. Préparation des pré-cultures

Après la revification des cultures conservées par congélation, nous avions procédé à des cultures sur bouillon M17 dans le but de récupérer les surnageants susceptibles de contenir la substance antibactérienne recherchée. La propagation est décrite dans la partie matériel et méthodes.

3.7.2. Séparation de la biomasse et récupération des surnageants

Les différents surnageants de cultures obtenus après propagation, ont été obtenus par centrifugation à 4000 rpmpendant 10 min. à 4 °C. Il est important de signaler que la vitesse utilisée pour la séparation de la biomasse est inferieure à celle préconisée par la littérature, àsavoir 8000 rpmpendant 10minutes permettant une meilleure séparation de la biomasse et un meilleur rendement en substance d'intérêt (DIOP *et al.*2007 et TODOROV *et al.*,2009) .

Les surnageants que nous avons dénommés « **SNCM » «SNCP» et « SNB»** correspondent respectivement à la culture de lactocoques camelins, à celle deslactocoques caprins et à celle deslactocoques bovins.

3.7.3. Mesure du pH des surnageants

Les surnageants présentent des valeurs de pH inférieures à celle des milieux de culture (M17 et MRS) (pH7.2 et 6.2 respectivement) . Le pH du SNCM atteint 6.3, celui du SNCP 4.6 et celui du SNB à 6.5 (figure 20). Ces valeurs indiquent un début d'activité métabolique, plus intense dans le cas du SNCP, ayant conduit à la formation de lactate responsable de l'abaissement du pH.

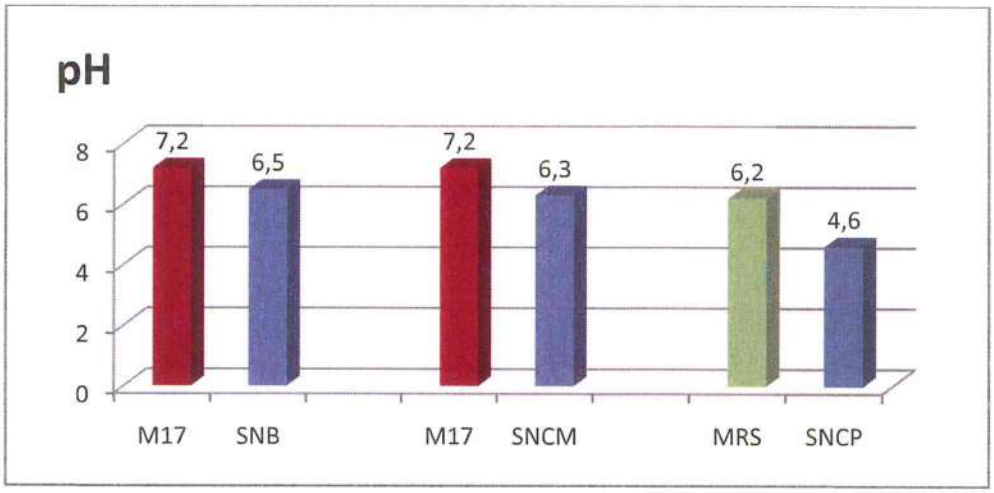

Figure 20: pH des surnageants de culture de Lc.

3.7.4. Tests d'antagonisme

Afin d'éliminer l'effet inhibiteur potentiel exercé par l'acide lactique à l'égard de la souche cible, *Staphylococcus aureus ATTCC11778,* les pH sont rajustés à6.5. avec NaOH 5N, stérile (NYKÄNEN *et al.*, 2000). Les résultats enregistrés mettent en évidence un effet antagoniste des surnageants à l'égard de la souche cible. Des ZI d'importance inégale selon l'origine du lait sont enregistrées. Du fait de la nature catalase + de la souche cible et de la neutralisation du pH du surnageant, l'inhibition a vraisemblablement pour origine une substance antibactérienne de « type bactériocine » produite par les Lc. Par ailleurs, certains auteurs rapportent que l'inhibition par le peroxyde d'hydrogène est souvent moins fréquente chez les bactéries lactiques (LABIOUI *et al.*, 2005 ;GONG *et al.*,2010).En effet, la production de peroxyde d'hydrogène par les bactéries lactiques est rare et le plus souvent en concentration trop faible afin de ne pas provoquer l'auto-inhibition de la souche productrice, et cela dans des conditions particulières en présence d'oxygène (JUILLARD *et al.*, 1987).

En revanche, l'effet antimicrobien des surnageants de culture, neutralisés (SN), issus de culture de *Lactococcus lactis* a été rapporté par la littérature (SIBOUKEUR, 2011). Dans le même ordre d'idée, un effet positif d'un SN, issu d'une souche de *Lactococcus lactis ssp .lactis* pour la conservation des poissons au Sénégal a été démontré (DIOP *et al.*, 2009).

3.7.4.1 Méthode des puits

Par cette méthode de test d'antagonisme, nous n'avonspas noté de présence de zones d'inhibition nettes (photo 5)

Photo 5: Test d'antagonisme des surnageants de culture de Lc à l'égard de *St.aureus*. : Test des puits (cas des SNCM)

3.7.4.2 Méthode des spots

L'effet de la substance antimicrobienne sur la souche pathogène*St.aureus* n'a été observé clairement dans aucun test réalisé par la méthode des spots.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par KERAMANE (2009) pour des souches utilisées pour un test préliminaire. Ces résultats sont aussi comparables à ceux obtenus par SIBOUKEUR etSIBOUKEUR (2013). Par ailleurs, ÇADIRCI et CITAK (2005), dans une étude de l'activité antibactérienne des bactériocines, suggèrent un contrôle de la méthode des spots par celle des disques, plus adaptée pour la recherche de cette activité dans le surnageant.

3.7.4.3 Méthode des disques

Les résultats obtenus avec cette méthode sont suffisamment nets pour suggérer un effet antibactérien positif pour tous les surnageants. Toutefois, le surnageant de la culture de Lc. caprins, affiche une zone d'inhibition plus importante que celle du surnageant camelin dont la ZI est plus importante que celle du surnageant bovin. Le diamètre de ZI caprine est égale à 8mm versus 7mm pour le diamètre des ZI caprines et 6 mm de diamètre de ZI bovine (photos 6 ,7 et 8). Les ZI obtenues sont comparables à celles obtenues par SIBOUKEUR,(2011) qui a enregistré des ZI de diamètre entre 6 et 8mm. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par KERAMMANE,(2009) et DOUMANDJI , (2010) .Ces auteurs

ont obtenu des ZI plus grandes. Selon HOLO *et al,.*(2002) ;RAJARAM *et al.,* (2010) ; SHARMA *et al.*, (2010),la possibilité d'adsorption partielle des molécules peptidiques de la bactériocine sur la paroi des Lc.et donc son élimination avec le culot peut expliquer l'obtention de petits diamètres d'inhibition . Par ailleurs, HOLO *et al,.* (2002) rapporte que, la production des bactériocines dans un milieu liquide est pauvre par rapport à leur production en milieu solide.Les facteurs qui influencent la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (DJADIOUI,2013). Selon DALIE et *al.,* (2010) in DJADOUNI,(2013), la température et la période d'incubation sont des facteurs essentiels pour moduler la croissance de bactéries lactiques et affecter de manière significative les quantités de métabolites produites. L'activité antimicrobienne est limitée par la diffusion des bactériocines (KAISER et *al.* 1993 ; VIGNOLO et *al.,*1995) .Dans le même ordre d'idée, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration constituaient un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (LEAL-SANCHEZ et *al.*, 2002 ; LEROY ET AL., 2006 ; CHEN et *al.*, 2007 ; ANASTASIADOU et *al.*, 2008). L'ajout de ces nutriments lors d'une culture *fed-batch* permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en *batch* (LV et *al.*, 2005).

En plus de cela, il est fort probable que l'utilisation d'une centrifugationà 4000 rpm au lieu de 8000 rpm soit à l'origine de faibles diamètres d'inhibition enregistrés dans la présente étude.

3.7.5. Nature chimique de la substance antibactérienne contenue dans les surnageants

L'activité antibactérienne est exercée exclusivement par des substances extracellulaires répandues dans le milieu de culture (ELMOUALDI *et al.* ,2008).

Dans cette étude, les tests effectués ont pour but de confirmer la nature protéique de la substance antibactérienne contenue dans les SN suite à une dénaturation physique, chimique, ou enzymatique. Nous avons fait appel à la méthode des disques pour réaliser de nouveau les tests d'antagonisme.

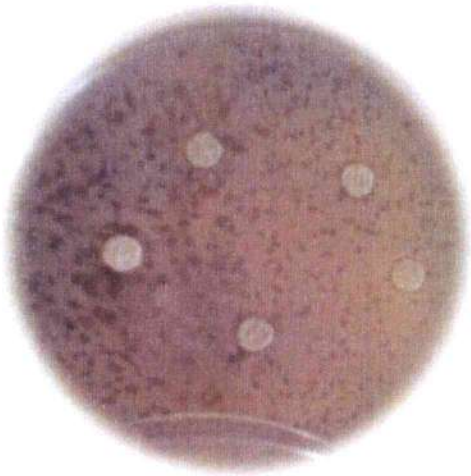

Photo 6 : Test d'antagonisme des SNCM à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923

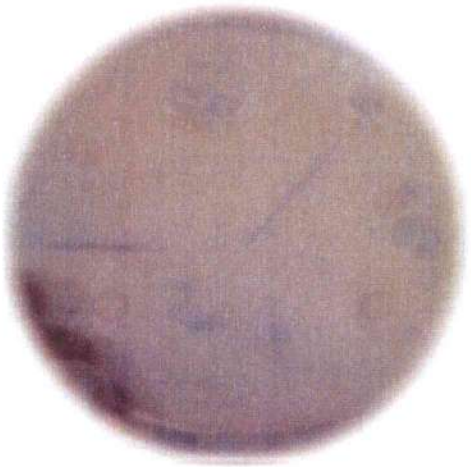

Photo 7 : Test d'antagonisme des SNCP à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923

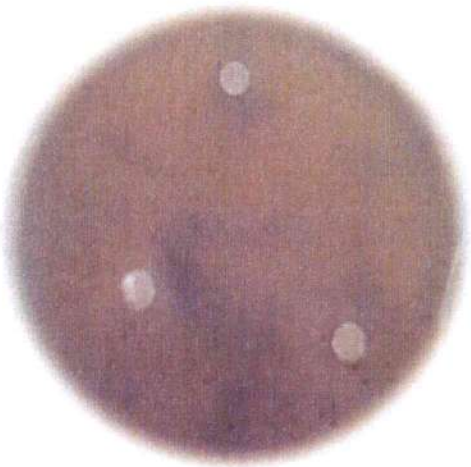

Photo 8 : Test d'antagonisme des SNB à l'égard de *Staphylococcus aureus*ATCC25923

3.7.5.1. Effet de température

Les traitements par la chaleur à 60, 70, 80, 90,99 pendant 10minetà 100°C pendant 20 min des lots de surnageants de culture, avec un surnageant non traité servant de témoin positif, ne semblent pas affecter l'activité antibactérienne qui persiste après les traitements. En revanche, le traitement à100°C durant 20 minutes permet l'obtention d'une zone d'inhibition insignifiante, d'où nature protéique de la substance (tableau XIV).à

On peut dire que la substance antimicrobienne présente dans les surnageants de Lc. camelins et caprins est une substance thermorésistante et thermostable.

Tableau XIV: Effet de la chaleur sur l'activité antimicrobienne

Surnageant	60 °C/10 min.	70 °C/10 min.	80 °C/10 min.	90 °C/10 min.	99 °C/10 min.	100 °C/20 min.
SNCM	7 mm	7mm	6 mm	9 mm	8mm	5mm
SNCP	8mm	8 mm	7.5mm	10mm	8mm	7mm
SNB	6mm	7mm	6mm	7 mm	6mm	6 mm

3.7.5.2. Effet du pH

Les pH des surnageants de culture sont ramenés à des valeurs comprise entre pH2 et pH10.Les surnageants dont les pH ont été ramenés à des valeurs comprises entre pH2 et pH10 donnent le même résultat que le surnageant non traité(témoin). L'analyse de l'effet du pH des surnageants sur l'activité de la substance bactéricide indique la présence de ZI (tableau XV).

La substance antimicrobienne présente dans les surnageants camelin et caprin est par conséquent une substance qui supporte une gamme de pH comprise entre 2 à 10. Ce résultat se rapproche de celui obtenupar METLEF et DILMI BOURAS(2009) selon lequel un pH compris entre 5 et 7 serait optimal pour le fonctionnement dela substance produite par une souche locale de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Tableau XV : Effet du pH sur l'activité antimicrobienne

Surnageant	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH8	pH 9	pH 10
SNCM	8 mm	9mm	6 mm	8 mm	8 mm	7 mm	7mm	6mm	6mm
SNCP	7mm	8 mm	7mm	10mm	8 mm	8mm	9mm	6mm	6mm
SNB	6mm	6mm	6mm	6 mm	6mm	6 mm	6mm	6mm	6mm

3.7.5.3. Sensibilité de la substance aux protéases

Des ZI ont été observées autour des disques imprégnés par les surnageants traités par la pepsine.L'activité des surnageants camelin et caprin n'est donc pas affectée, par l'action de cette enzyme. Ces résultats suggèrent une résistance, des bactériocines produites par les souches de lactocoques à la pepsine.

La thermostabilité, la résistance à des pH acide et basique et la résistance à la pepsine sont de nature àsuggérer que la substance produite par lesLc. camelins et caprins est une bactériocine (type nisine). En effet, selonKLAENHAMNER, (1988), les bactériocines sont des peptides antibactériens qui ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide.Elles sont thermostables. Elles sont généralement thermorésistantes et supportent de grands écarts de pH (2 à 10) (PARADA *et al.*, 2007). Selon CHOI et al.(2008), une bactériocine type nisine produite par *Lactococcus lactis*subsp. *lactis A164*, supporte des températures élevées à des pH bas alors qu'elle perd son activité à des pH élevés .Cette activité n'est pas inhibée en présence de pepsine.Toutefois, il faut signaler que certains auteurs rapportent que plusieurs facteurs parmi lesquels, l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance, peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'activité antimicrobienne (NESS *et al.*, 1996).

3.8 .Optimisation des conditions de conservation des souches bactériocinogènes

En nous servant des courbesd'étalonnage (figures 21 et 27), nous avons procédé à la quantification de la biomasse. Des courbes d'évolution de la souche réfrigérée (4^0C), congelée sans cryoprotecteur et congelée en présence de cryoprotecteurs durant 20 jours de stockage à(-20^0C) ont été réalisées. Le pH est relevé pour chaque échantillon prélevé à partir d'un lot(tableau V).

Afin de pouvoir tirer des conclusions sur l'optimisation des conditions de conservation des souches camelines et caprines et de trouver la meilleure méthode de conservation, nous avons procédé au calcul des taux de survie des souches de lactocoques camelines et caprines pour les différents lots expérimentaux.

3.8.1 .Optimisation des conditions de conservation des souches camelines

3.8.1.1. Courbe étalon

Une courbe d'étalonnage DO en fonction des différentes dilutions (figure 21), est utilisée pour calculer les concentrations cellulaires des différents lots expérimentaux après trois semaines de conservation.

L'évolution quantitative de la biomasse cellulaire et celle du pH durant le stockage est suiviependant 20 jours d'entreposage (4^0C, - 20^0C avec et sans cryoprotecteurs) (figures 22 , 23,24,25 et 26) .

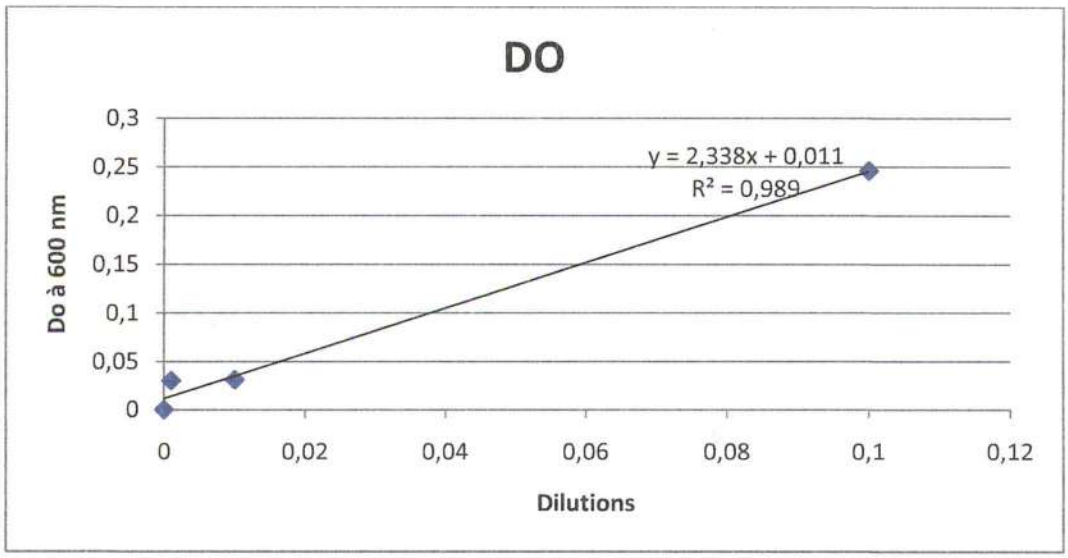

Figure 21 : Courbe d'étalonnage : DO en fonction de la concentration cellulaire de la souche de Lc. camelins

3 .8.1.2. Réfrigération

La réfrigération est une méthode utilisée pour la conservation des bactéries lactiquescommercialisées.Toutefois, les procédés les plus utilisés à l'échelle industrielle demeurent la congélation et la lyophylisation. Ces deux techniques permettent de satisfaire aux critères suivants:

- Conservation de longue durée ;
- transport facile ;
- reprise d'activité.

La figure 22 semble indiquer une diminution de la biomasse durant l'entreposage de la culture des lc. Camelins à 4^0C ce qui indique une mort cellulaire. La biomasse passe en effet de 4,76 x10^5cellules/ml à J_0 à 3,26x10^5cellules/ml J_{0+20} (ANNEXE 08). La réduction de la croissance montre que cette méthode ne permet pas une conservation de longue durée de ces souches lactiques. Rappelons que milieu de conservation permet seulementle maintien des cellules en vie seulement si les conditions s'y prêtent et non leur croissance.

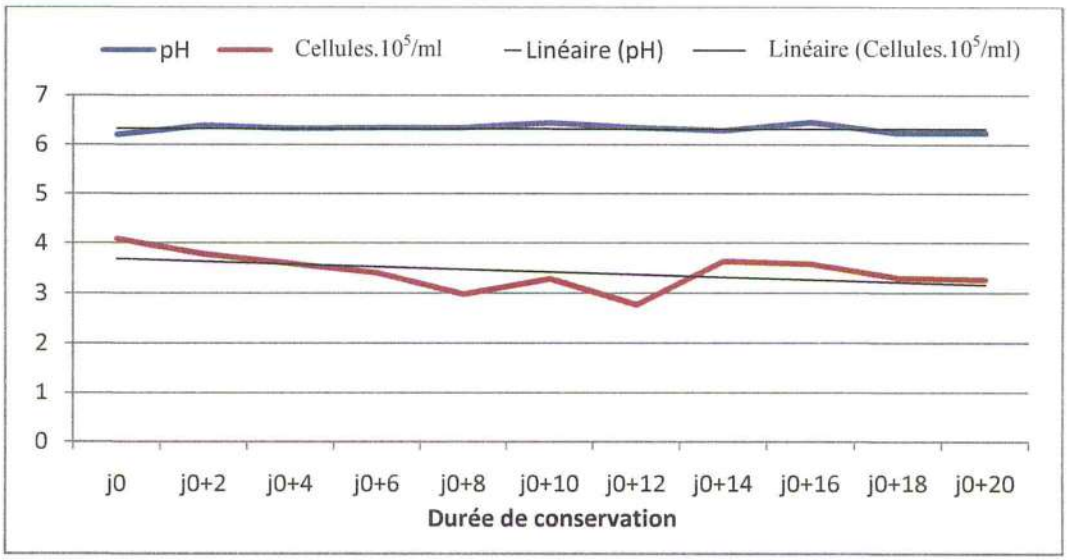

Figure 22: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée à 4 °C et du pH.

Nous remarquons parallèlement que le pH est pratiquement stable durant la période de stockage, ce qui sembleconfirmer l'absence d'une activité métabolique et donc l'absence d'une croissance microbienne mais plutôt une destruction de la masse cellulaire en fin de stockage.

3.8.1.3 Congélation sans cryoprotecteur

Durant les 20 jours de conservation, la concentration cellulaire et le pH du milieu semblent presque stables. La biomasse passe de $4,57x10^5$cellules/ml (à J_0) à $4,46x10^5$cellules/ml (à J_{0+20}) (ANNEXE 08). La congélation sans cryoprotecteurs semble avoir protégé les cellules contre les dommages susceptibles de leur être causés par les températures basses (figure 23).

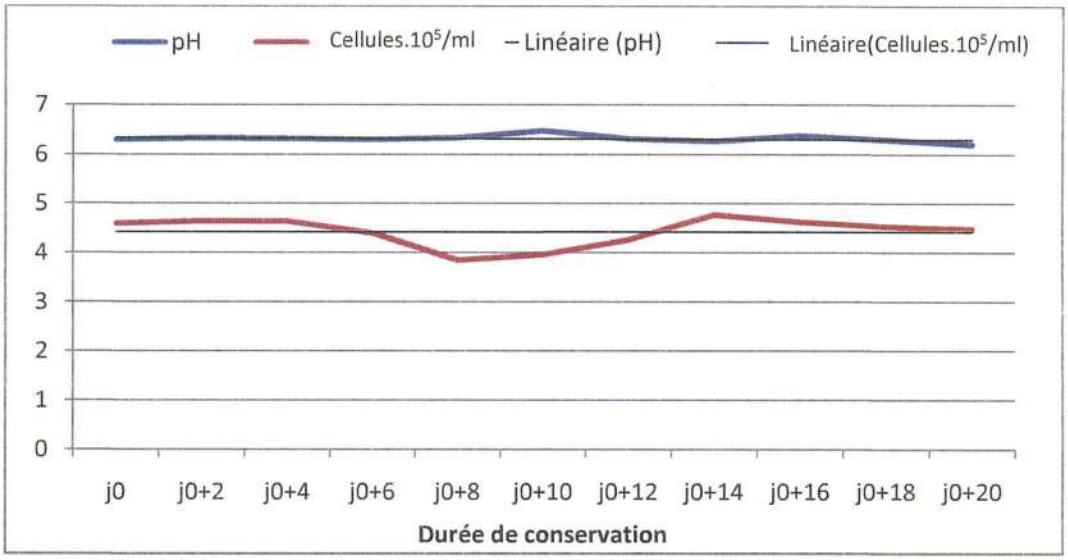

Figure 23: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation sans cryo-protecteur et du pH.

3.8.1.4 Congélation avec le saccharose (12%)

La figure 24 montre l'évolution de la masse microbienne des lactocoques camelins durant les 20 jours de conservation par congélation avec addition de 12%de saccharose.

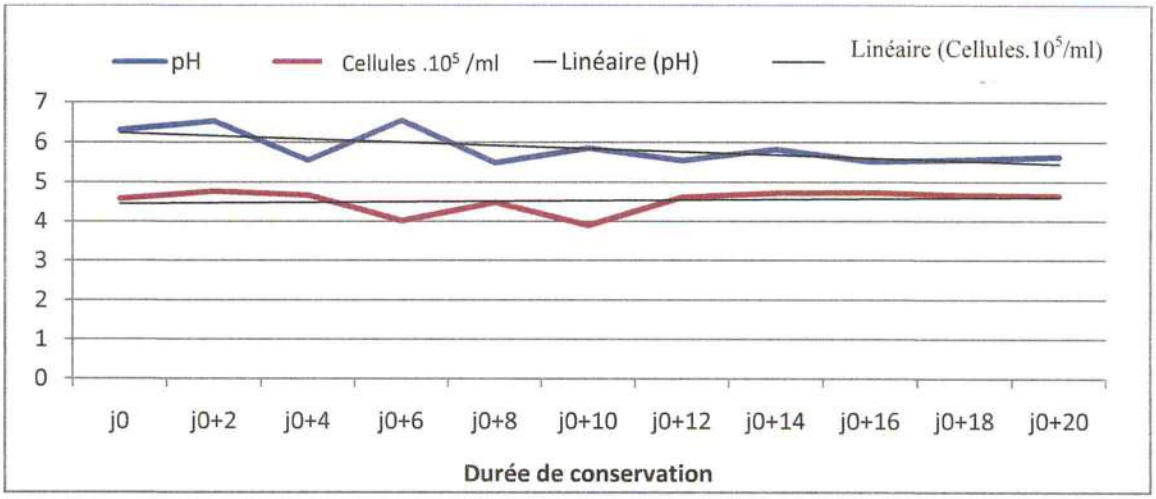

Figure 24: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de saccharose (12%)et du pH.

Nous remarquons que la biomasse passe de 4.57 x10^5cellules/ml à J_0à 4.64 x10^5 cellules/ml à J_{0+20}.Cette augmentation bien que sensible,concorde avec la diminution du pH.En effet, ce dernier passe de 6 .30 à J_0 à 5.63à J_{0+20}(ANNEXE 08), ce qui indique laprésenced'une légère activité métabolique. Etant donné la nature du milieu de conservation, on est tenté d'attribuer cette activité métabolique à une mauvaise conduite dela décongélationcar parmi les facteurs qui influencent la survie des bactéries soumises à la congélation, les auteurs citent la température, la vitesse et la durée de la décongélation. Celle-ci doit être réalisée à une vitesse aussi élevée que possible ; il est en effet nécessaire de minimiser l'action néfaste des phénomènes osmotiques et physicochimiques qui prennent place dans l'intervalle de température entre transition vitreuse et fin de fusion de glace (SIMATOS et *al.*1994).

3.8.1.5. Congélation en présence de DMSO (5%)

La figure 25 représente l'évolution de la concentration microbienne des lactocoques camelinsconservés par congélation en présence deDMSO à raison de 5%.

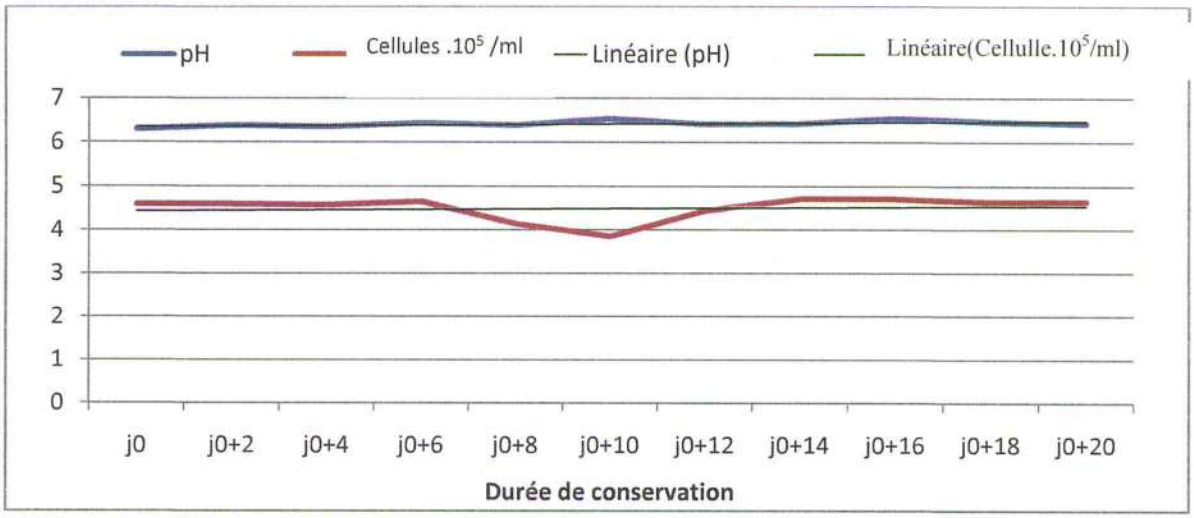

Figure 25: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de DMSO (5%) et du pH

Une stabilisation de la biomasse est remarquée durant la période de conservation.Parallèlement, le pH semble globalement stable. Cela indique l'absence d'une activité métabolique et maintien de la charge initiale (ANNEXE 08).

3.8.1.6. Congélation en présence de glycerol (15%)

L'évolution de la biomasse conservée par congélation en présence de ce cryoprotecteur est illustrée par la figure 26.

Nous remarquons que la biomasse diminue sensiblement puisqu'elle passe de 4.57 $x10^5$ cellules /ml à J_0 à 4. 30 $x10^5$ cellules /ml à J_{0+20}(ANNEXE 08).

Le pH par contre, semble rester stable, ce qui indique l'absence d'une activité métabolique.

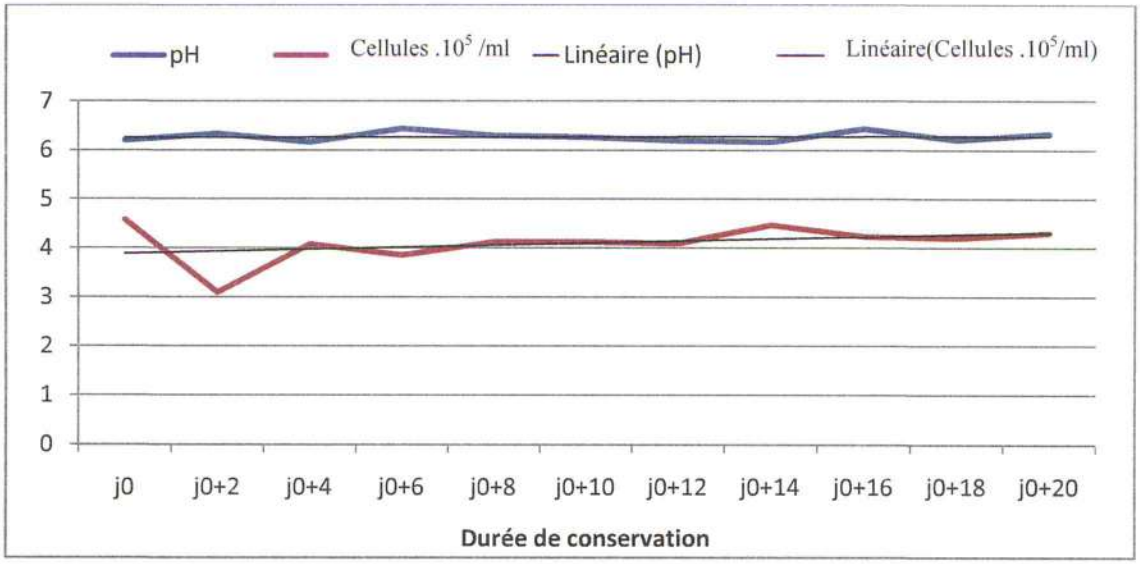

Figure 26: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques camelins, conservée par congélation en présence de glycérol (15%) et du pH

3.8.1.7.Taux de survie des souches camelines

La conservation des souches par congélation en l'absence de cryoprotecteurs semble meilleure par rapport leur conservation par réfrigération, puisque le taux de survie des cellules congelées est égale à 99.81% versus 98.28% dans le cas de la réfrigération après 20 jours de stockage.La conservation par congélation en présence de DMSO ou de saccharose donne des taux de survie proches de 100%. L'utilisation du glycérol permet un taux de survie de 99.53% donc comparable à celui obtenu en l'absence de cryoprotecteurs (ANNEXE 08). Ce résultat est de nature à suggérer que la conservation des lactocoques camelins peut être réalisée par congélation en l'absence de cryoprotecteurs ou en présence de DMSO (5 %) ou de saccharose (12%).Dans ces conditions, les cellules sont suscetibles d'être protégées contre les dommages potentiels causés aux cellules par la congélation. On parle dans ce cas de cryorésistance (SIMATOS ,1994)

3.8.2 .Optimisation des conditions de conservation des souches caprines

3.8.2.1. Courbe étalon

La courbe d'étalonnage (DO en fonction des dilutions) (figure 27) est utilisée pour calculer la concentration cellulaire des différents lots expérimentaux après leur conservation.

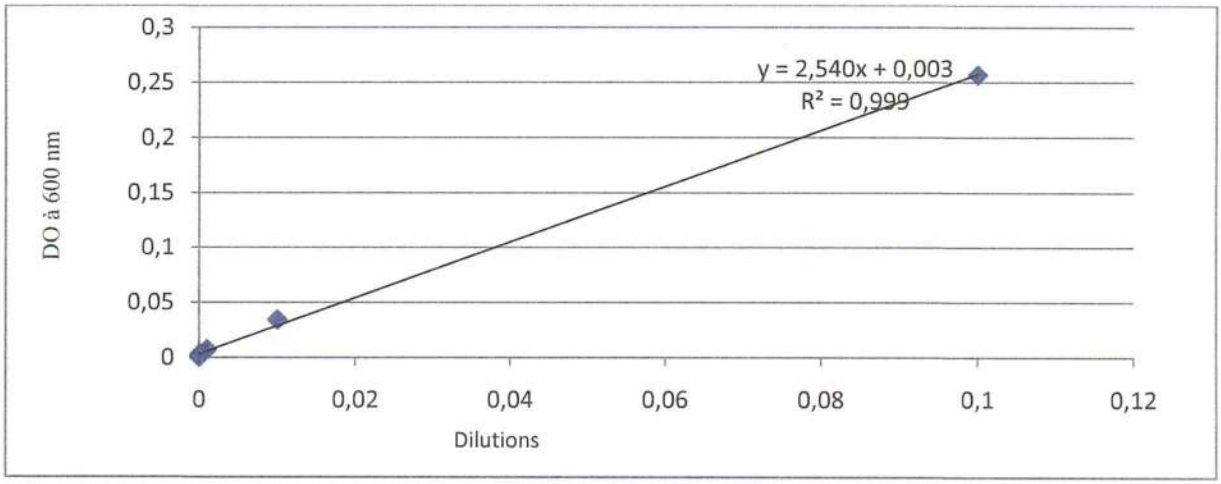

Figure 27 : Courbe d'étalonnage (DO en fonction de la concentration cellulaire de la souche de Lc. caprins)

L'évolution de la biomasse lactococcique caprine et du pH du milieu de conservation au cours du stockage pendant 20 jours par réfrigération ou congélation en l'absence ou en la présence des 03 cryoprotecteurs (DMSO 5 %, Saccharose 12%, glycérol 15%) est présentée dans les figures 28, 29,30,31 et 32 .

3 .8.2.2. Réfrigération

A travers la figure 28, nous constatons une diminution de la biomasse qui passe de 2.85 x 10^5 cellules/ml à J_0 à 1.96 cellules/ml à $J_{0+20.}$ (ANNEXE 08).Concernant le pH, nous n'avons pas remarqué de différence remarquable entre le début et la fin de la durée de conservation.

Il ya donc absence d'activité métabolique ou au moins une faible activité. La réfrigération ne semble pas convenir à la conservation de longue durée de cette souche d'intérêt.

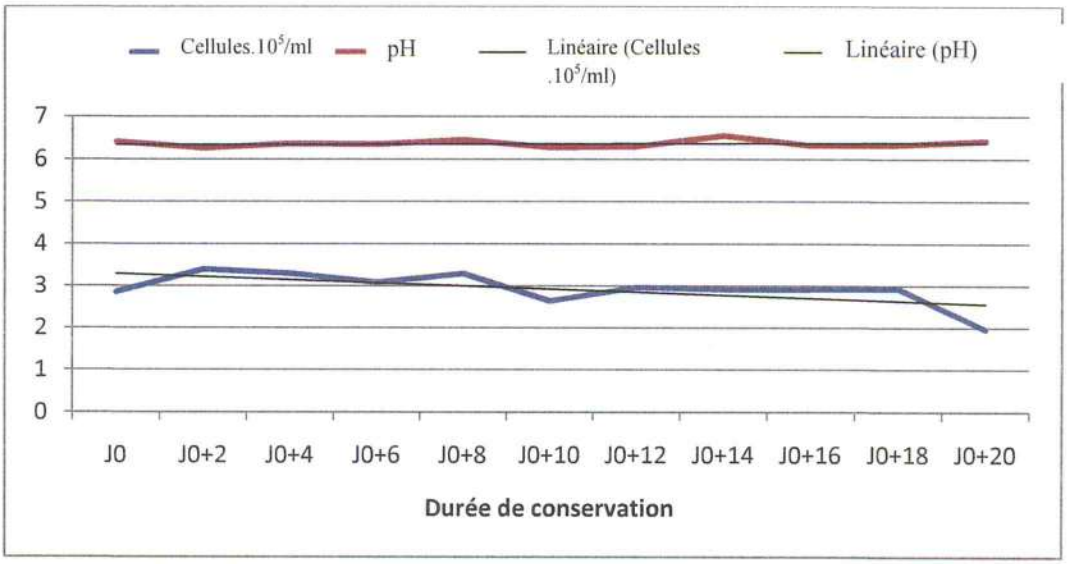

Figure 28: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée à 4 °C et du pH.

3.8.2.3 Congélation sans cryoprotecteur

Nous remarquons que globalement, il ya une stabilisation de la concentration cellulaire durant la periode de conservation puisque la biomasse passe de 3.30 x 10^5 cellules/ml à J_0 à 3.07 cellules/ml à J_{0+20}(ANNEXE 08). Le pH montre une légère augmentation qui passe de 6.32 à J_0 à 6.63à J_{0+20} (figure 29). Il semblerait par conséquent que les cellules congelées sans cryoprotecteur ont pu résister à l'effet de la température de congélation (cryorésistance).

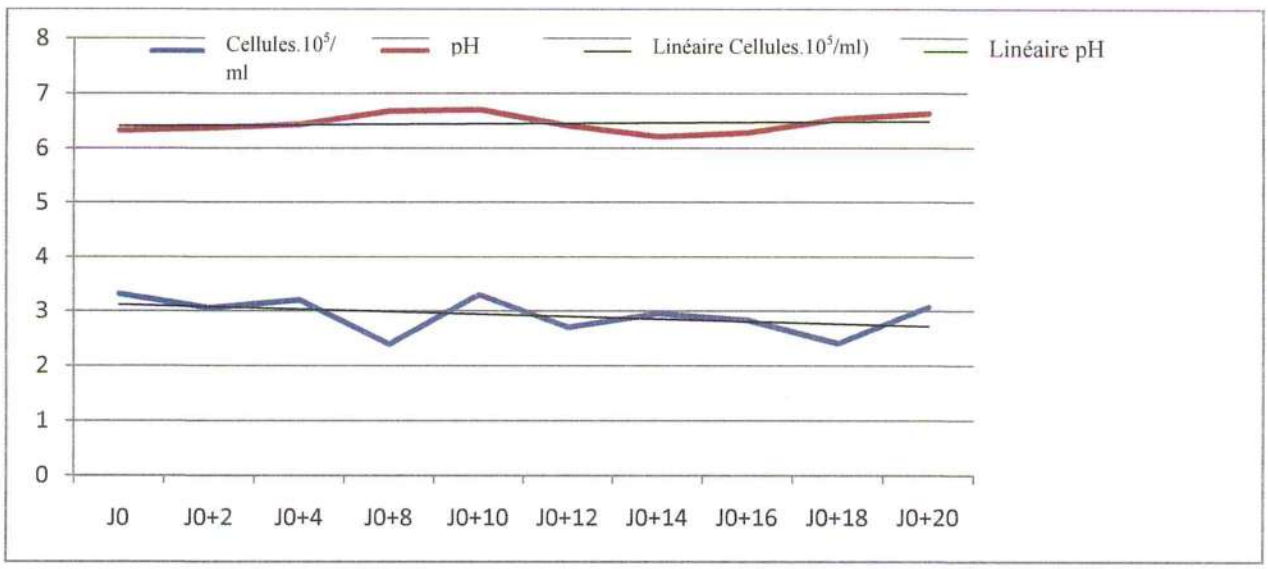

Figure 29: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation sans cryo-protecteur et du pH.

3.8.2.4. Congélation en présence de saccharose (12%)

La figure 30 montre l'évolution de la masse microbienne de lactocoques caprins durant les 20 jours de conservation par congélation en présence avec de saccharose.

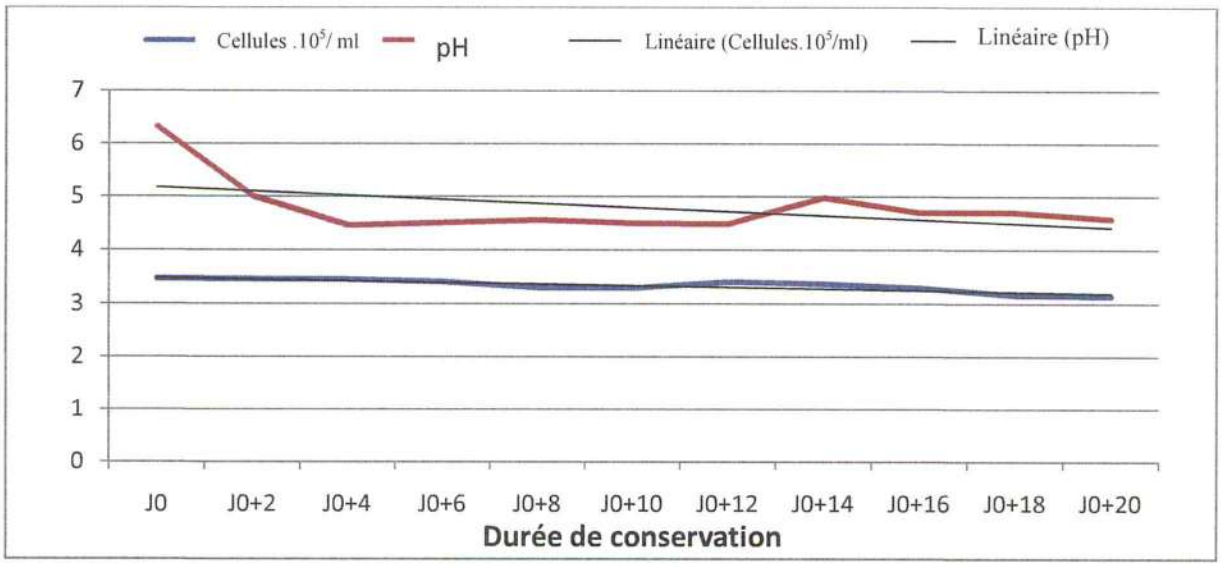

Figure 30: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de saccharose (12%)et du pH.

Nous remarquons que la biomasse est stable durant la période de stockage des lactocoques alors que le pH enregistre une diminution qui passe de 6 .32 à J_0 à 4.58 à J_{0+20}ce qui indique une présence d'une activité métabolique des cellules(ANNEXE 08).

3.8.2.5. Congélation en présence de DMSO (5%)

La figure 31 représente l'évolution de la concentration microbienne des lactocoques camline entreposées par la congélation en présence de5% de DMSO.

Nous remarquons ,une diminution de la biomasse qui passe de $3.25x10^5$ cellules /ml à J_0 à 2.85 $x10^5$ cellules /ml à J_{0+20}(ANNEXE 08) . Le pH est presque stable. On peut prétendre à l'absence d'une activité métabolique

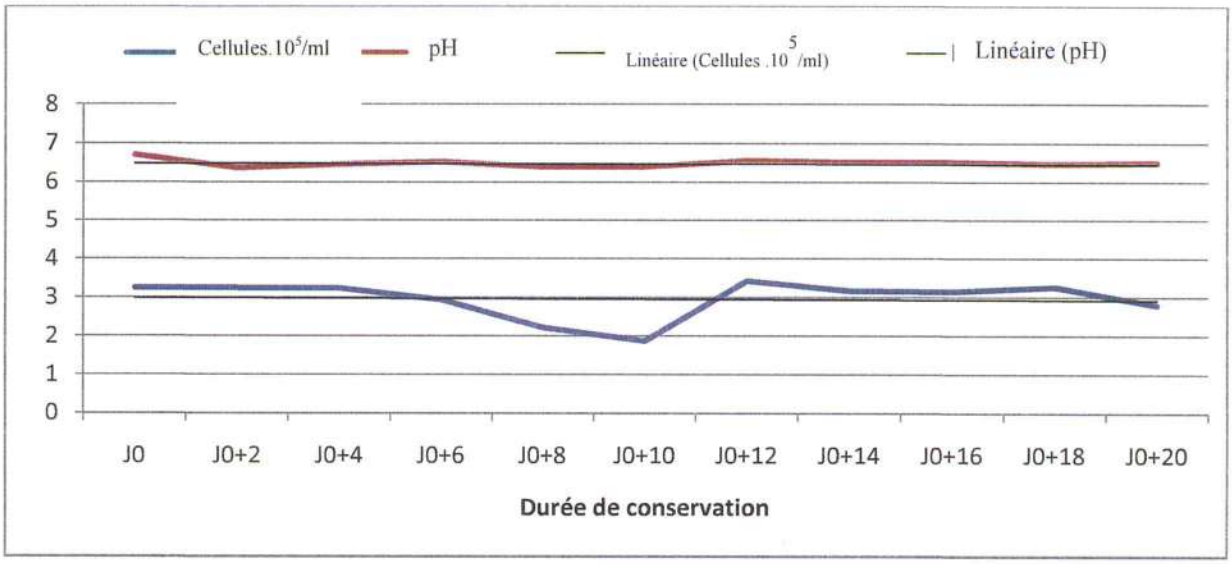

Figure 31: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de DMSO (5%) et du pH

3.8.2.6. Congélation en présence de glycerol (15%)

L'évolution de la biomasse des lactocoques caprins conservés par congélation en ajoutant le glycérol 15% comme cryoprotecteur est illustrée dans la figure 32.

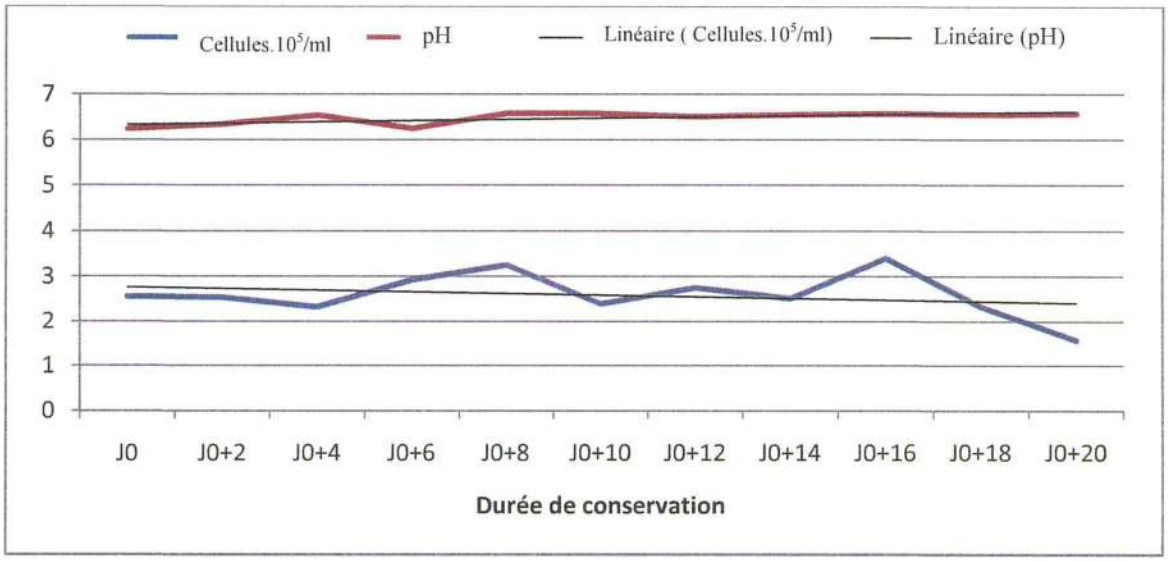

Figure 32: Evolution de la concentration cellulaire de la souche de lactocoques caprins, conservée par congélation en présence de glycérol (15%) et du pH

Nous remarquons une diminution de la concentration cellulaire qui passe de $2.56x10^5$ cellules /ml à J_0 à $1.57 x10^5$ cellules /ml à J_{0+20}(ANNEXE 08) .Toutefois , nous remarquons qu'en présence de ce cryoprotecteur les cellules semblent être protégées jusqu'au 19ème jour

puisqu'à $J_{0+18,}$ nous avons enregistréun taux égal à 2.32 x x10^5 cellules /ml. Le pH est à presque stable d'où activité métabolique faible voie nulle.

3.8.2.7. Calcul du taux de survie des souches caprines

Les résultats semblent indiquer que la conservation des souches par congélation sans cryoprotecteurs est meilleure que leur conservation par réfrigération car le taux de survie des cellules congelées est de 99.43% versus 97.01% pour la réfrigération. La conservation des souches par congélation en présence de saccharose donne un taux de survie égale à 99.60%.L'utilisation du glycérol comme cryoprotecteur a permis dans le cas de la présente étude l'obtention d' un taux de survie de l'ordre de96.07% .

3.8.3. Etude statistique

Les tests statistiques montrent une corrélation très hautement significative entre les différents traitementsde conservation et la concentration cellulaire ($p<0.001$). Le test de groupes homogènes (Pairwise wilcoxon test) indique l'existence de 02 groupes distincts. Un groupe comprenant la congélation en présence de DMSO, la congélation en présence de glycérol, celle en présence de saccharose et celle sans cryoprotecteur. Le deuxième groupe comprend seulement la réfrigération.

En effet, pour la conservation des souches camelines, la congélation semble plus efficace comparativement à la réfrigération. Les cryoprotecteurs (DMSO,glycérol ou saccharose) ne semblent pas exercer un effet positif significatif sur la conservation par congélation des Lc camelins pour une période de conservation de vingt jours. Donc la congélation durant un entreposage de vingt jours à -20°C, sans cryoprotecteurs ou en leur présence aurait le mêmerésultat sur la survie de cette souche d'intérêt.

Concernant les lc. caprins, les mêmes tests statistiques indiquent l'existence d'une différence hautement significative ($p<0.01$) entre les traitements. Les tests de groupeshomogène (Pairwise wilcoxon test) indique l'existence de trois groupes différents. Le premier englobe la réfrigération, la congélation sans cryoprotecteur et la congélation en présence de DMSO. La congélation en présence de saccharose constitue un groupe à part, le meilleur taux de survie est obtenu avec 12% de saccharose. Le glycérol constitue un groupe intermédiaire part avec lequel le taux de survie est le plus bas.

Le problème lié à la conservation par le froid est celui de la formation de cristaux de glace qui peuvent être très dommageables pour les cellules (SIMATOS et *al.*, (1994) ; FULLER (2004).

Toutefois, il ne fait aucun doute que plus la température de stockage est basse, plus elle est meilleure (SIMATOS et *al.*, 1994). Cela explique l'efficacité de la congélation par rapport à la réfrigération. Néanmoins, à des températures largement inférieures à0°C, peuvent encore se produire des phénomènes biochimiques et biophysiques tels que les échange ioniques(au moins jusqu'à-40°C),activités enzymatiques(-25°C) et même des multiplications bactériennes(-8°C) (SIMATOS et *al.*,1994). Ceci pourrait expliquer le comportement de nos souches expérimentales placées dans les conditions décrites (congélation à -20°C) ayant provoqué l'augmentation de la concentration cellulaire dans certains cas.

Par ailleurs, l'abaissement de la température, le changement d'état de l'eau en glace,la conservation à l'état congelé et la décongélation peuvent être à l'origine de phénomène très susceptibles d'affecter la survie ou les activités caractéristiques des cellules (SIMATOS et *al.*(1994). Il semble que dans notre cas la congélation n'a pas exercé des dommages importants sur les cellules, étant donné que les taux de survie étaient le plus souvent élevés. Toutefois, il est important de prendre en considération la durée de l'entreposage qui n'était pas suffisamment longue.

Les cryoprotecteurs sont des substances permettant aux cellules de mieux supporter les basses températures (inférieure à -50°C) lors de l'entreposage (SIMATOS et *al.* 1994) puis la décongélation lente. Les cryoprotecteurs semi perméables, tel que le saccharose, induisent une déshydratation partielle des cellules avant la congélation. Ils se concentrent entre la membrane cytoplasmique et la paroi comme une couche de tampon qui agit contre la croissance des cristaux de glace et protège la membrane mécaniquement (HUBALEK, 2003). Les sucres sont capables de fournir une bonne protection pour les bactéries, Il a été démontré également que les sucres notamment le saccharose permettent de stabiliser les membranes durant l'exposition hypertonique lors de la croissance de cristaux de glace, par interaction avec les groupes polaires des phospholipides (FULLER, 2004).

La perméabilité de certains de ces solutés dépend nettement de la température et du type cellulaire. Le DMSO pénètre dans la paroi et dans la membrane (HUBALEK, 2003).

Le Glycérol est un soluté poly-hydroxylé avec une forte solubilité dans l'eau, et une faible toxicité lors de l'exposition à court terme des cellules vivantes (FULLER, 2004). En général, on procède à un refroidissement lent et progressif, lors de l'utilisation de cryoprotecteurs pénétrant les cellules tel que le glycérol.

CHAVARRI et *al.*(1988) ont montré que pour *Lc lactis subsp lactis*,le lactose et le saccharose(5%) étaient plus efficace que le glycérol, par contre un effet négatif de lactose sur la survie de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et subsp. *lactis* biovar. *diacetylacis* a été rapporté par les mêmes auteurs.

Dans le même ordre d'idée, un taux de survie égale à 76 .05% pour des souches de *Streptococcus thermophilus* camelins conservés par congélation sans cryoprotecteurs pendant un mois est rapporté par BALLA (2011). Ce même auteur a obtenu des taux de survie égaux à 97.99% ,97.80%,97.89% pour des souches conservées respectivement par congélation avec DMSO, glycérol et saccharose.

3.9. Essais de bioconservation des viandes cameline et de poulet : Utilisation des souches bactériocinogènes isolées à partir des laits camelin et caprin

Dans cette partie de l'étude, nous avons commencé par la mesure du pH et par des analyses microbiologiques de deux types de viande très consommées localement(la viande cameline et le poulet). Le but de ces analyses préliminaires est de vérifier leur qualité microbiologique en quantifiant la charge bactérienne initiale (flore aérobie mésophile totale), en recherchant une éventuelle présence de bactéries halotolérantes notamment l'espèce *Staphyloccocus aureus*et en la quantifiant.Après cette étape, nous avons procédé à des essais de bioconservation de ces viandes en utilisant les surnageants issus de cultures de lactocoques camelins, caprins et bovins. Les surnageants bovins sont utilisés à des fins comparatives. Parallèlement des essais de conservation faisant appel à l'utilisation directe des souches de lactocoques isolées à partir des laits, camelin, caprin et bovin (production *in situ* de substances antibactériennes)ont été également réalisés.

3.9.1. Analyses préliminaires des viandes

3.9.1.1. Mesure du pH

La valeur du pH de la viande est le résultat de la dégradation du glycogène juste après l'abattage. Il est généralement voisin de 7 (CRAPLET, 1966 inBENAISSA).

La viande cameline ayant fait l'objet de la présente étude présente un pH égale à 5.3 et le poulet un pH égale à 6.2. La valeur de pH pour la viande cameline est proche de celle constaté par BENAISSA,(2011) à savoir pH 5.96.

L'ensemble des réactions survenant dans la cellule musculaire post mortem, suite à la libération dans le sarcoplasme des ions calcium qui stimulent l'activité ATPasique ducomplexe acto-myosine, entraînant ainsi la libération de phosphate inorganique, conduit àl'accumulation d'acide lactique. Ces phénomènes provoquent une acidification progressive du muscle et donc une chute de pH musculaire post mortem qui se poursuit jusqu'à l'arrêt desréactions biochimiques (ou glycolyse). Le pH post mortem est appelé pH ultime ou pHu (ElRAMMOUZ, 2005)

La valeur du pH ultime est très variable.Elle dépend de l'espèce animale et du muscle proprement dit. L'amplitude de la chute du pHu (pH ultime) est dépendante du type de fibres musculaires. En effet, l'amplitude de la chute du pH dépend essentiellement du taux de glycogène musculaire,au moment de l'abattage. Elle est d'autant plus importante que le taux de glycogène des fibres et élevé. Le pH ultime est d'autant plus bas que la proportion de glycogène est élevée (HAY *etal.*, 1973; LABORDE *et al.*, 1985).Cela explique la lenteur de la résorption du Rigor Mortis avec les carcasses de viandes rouges et sa rapidité chez le poulet (viande blanche).

3.9.1.2. Analyse microbiologique de viandes

Nous avons réalisé dans la présente étudele dénombrement de la FAMT et celui des souches sauvages de*Staphylococcus aureus*(NF V 08-011N et NF V 08-51).

3.9.1.2 .1.Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT)

Le résultat de germes dénombrés par g de produit est noté par un nombre compris entre 1 et 9.9 multiplié par 10^{n} où n est la puissance appropriée de 10. Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule. Ils sont donnés en logarithme décimal d'unité formant colonies (LARPENT, 1997 et DUTRUC- ROSSET, 2003)

La FMAT des produits carnés étudiés, développée sur milieu PCA a été soumise à une numération à l'aide d'un compteur de colonie.

Le nombre de germes par gramme de produit calculé selon la formule : $\mathbf{N= \Sigma c/ v (n_1+ 0.1 n_2) /d_1}$ (DOUADI, 2002) est égale à 4.40x 10^5ufc / gde viande cameline et à 5.6 x 10^3ufc / g pour le poulet (tableauxXVI et XVII).

Tableau XVI: Dénombrement de FMAT (viande cameline)

Dilution / Boite	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Moyenne
Boites 1	Indénombrable	Ind	250	180	**112**	**45**	**$4.40x10^5$ ufc / g**
Boites 2	Indénombrable	Ind	242	186	**93**	**41**	

Photo 9: Développement de la FMAT de la viande cameline sur milieu PCA

Tableau XVII: Dénombrement de FMAT (poulet)

Dilution / Boite	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Moyenne
Boites 1	Indénombrable	220	**130**	**50**	<15	<15	**$5.6x10^3$ ufc/g**
Boites 2	Indénombrable	206	**135**	**56**	<15	<15	

Selon les normes la FAMT ne doit pas dépasser 5.10^2 germes/g pour la viande rouge et 5.10^5germes /g pour la volaille. La qualité microbiologique des échantillons de viande cameline n'est donc pas conforme aux normes règlementaires puisque les valeurs enregistrées sont respectivement égales à $4.40x10^5$ ufc / g. En revanche, la viande de poulet est conforme aux normes puisque elle présente un taux égale à 5.6×10^3ufc / g(tableau XVII).

Selon FEURER et *al*., (2013),dans la filière viandes et produit carnés, quelque soit l'espèce, les viandes sont naturellement contaminées .La majorité des contaminations trouve son origine aux trois stades critiques suivants :

- La contamination liée à l'animal vivant(cuir, peau, plumes…) ;

- La contamination au cours de l'abattage, notamment au stade de l'éviscération;

- Celle inhérente aux différentes étapes de transformation(découpe, hachage, conditionnement…) (BENAISSA et *al* ., 2014a ; BENAISSA et *al* ., 2014b ; BENAISSA et *al* ., 2015).

3.9.1.2 .Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Les *St. aureus* cultivés sur milieu sélectif Baird Parker agar (photo 10) sont soumis à des numérations. Les résultats de ces dénombrements sont consignés dans les tableaux suivants.

Photo 10: Colonies de *St. aureus* sur milieu BP

Tableau XVIII: Dénombrement des *St. aureus* de la viande cameline

Dilution / Boite	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Moyenne
Boites 1	Indénombrable	Ind	Ind	287	**185**	**80**	$1.65x10^{6}$ufc/g
Boites 2	Indénombrable	Ind	Ind	290	**179**	**102**	

Tableau XIX: Dénombrement des *St. aureus du* poulet

Dilution / Boite	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Moyenne
Boites 1	Ind	Ind	280	**113**	**44**	<15	1.09×10^{5}ufc/g
Boites 2	Ind	Ind	283	**120**	**56**	<15	

Selon les normes de l'arrêté du 21décembre1979, le taux de *St. aureus*d'une viande fraîche ne doit pas dépasser le seuil m = 5.10^{2} germes/cm^{2}et 10^{3}germes/g pour la volaille (GUIRAUD, 2012). La viande cameline n'est donc pas conforme aux normes règlementaires puisque le taux enregistré est à hauteur de $1,89x\ 10^{4}/cm^{2}$. Le poulet enregistre également un taux dépassant les normes réglementaires (1.09×10^{5} ufc/g) (tableau XVIII etXIX). La contamination de la viande cameline a été rapportée par des travaux antérieurs (BENAISSA,

2015); la méthode spécifique de l'abattage et des pratiques annexes de boucherie (dépeçage éviscération…), des dromadaires en serait responsable (BENAISSA, 2015).Dans ce contexte, des souches de staphylocoques de contamination des viandes,ont été classées sur la base de quatre caractères biochimiques variables(staphylokinase, hémolysine β, coagulation du plasma bovin et réaction au cristal violet) en fonction de leur origine (Homme ou animaux), en biotypes encore appelés biovars ou écovars « spécifiques d'hôtes » par opposition à certaines souches, isolées d'hôtes variés, pouvant présenter plusieurs biotypes dits « non spécifiques d'hôte » (De BUYSER et SUTRA ; 2005).Les auteurs ont évoqué en plus, l'existence d'un nouveau biotype, désigné « abattoir » parce qu'il est fréquemment rencontré parmi les souches isolées de viandes et du personnel découpant ces viandes dans les abattoirs. Un biotype « volaille » nese distinguant du premier que par un caractère supplémentaire (la protéine A) ou au moyen de méthodes de typage moléculaire plus difficiles à mettre en œuvre,a également été mentionné (De BUYSER et SUTRA ; 2005).

3.9.2. Essais de bioconservation des produits carnés

Des travaux récents, ont montré par le biais des tests d'antagonisme, qu'en culture mixte, les Lc. sont stressés et produisent de ce fait plus de molécules bactéricides (de type nisine) (DJENANE, 2012 ; SIBOUKEUR, 2012). Le but secondaire des essais entrepris dans la présente étude est d'estimer la part de la nisine dans le système de défense des Lc .Les résultats enregistrés sont illustrés par les figures ci-après.

3.9.2.1-Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* durant l'entreposage de la viande cameline à 4^0Cpendant sept jours

L'évolution quantitative de la souche sauvage (*St.aureus*), durant l'entreposage de la viande cameline à 4^0C pendant sept jours est présentée dans les figures 33,34,35, et 36.

3.9.2.1.1. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C

Nous remarquons que les courbes relatives aux SNCP et SNCM se trouvent en dessous de celle des SNB (témoin) (figure 33). Parallèlement, l'allure de la courbe SNCP est différente de celle du SNCM mais similaire à celle du témoin (SNB). L'analyse statistique

montre une différence significative ($p<0.05$) entre la concentration des Staph. et l'origine des surnageants.

Par ailleurs, nous remarquons une augmentation du nombre de Staph de J0 (6.21 Log ufc /g) à J0+1 (6.35, 6.57 et 7.37 Log ufc/g) respectivement pour les SNCM, SNCP et SNB. Cette augmentation est donc plus importante dans le cas du surnageant témoin. Nous constatons ensuite une légère diminution de la charge staphylococcique dans tous les cas de J0+1 jusqu'à J0+2 (6.21, 6.41 et 7.36 Log ufc/g) respectivement pour les SNCM, SNCP et SNB. Ensuite le SNCP montre une action antibactérienne importante en provoquant une diminution importante des Staph. dont le nombre atteint 5.29 Log ufc/g. Le meme comportement est enregistré avec le témoin (6.69 Log ufc/g à J0+6). Pour le SNCM, il semblerait que l'activité antibactérienne s'arrête à J0+2 puisque nous constatons une reprise de la croissance cellulaire (6.49 Log ufc/g à J0+6) (ANNEXE 09).

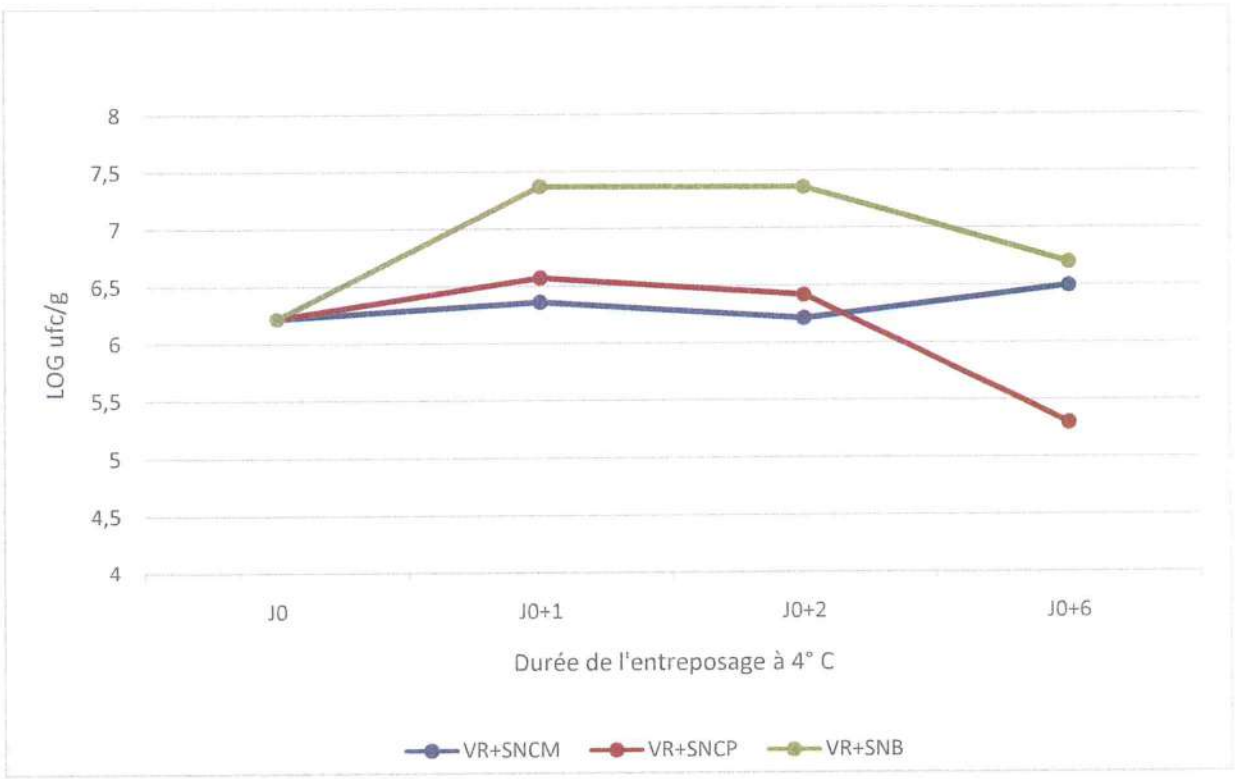

Figure 33: Evolution des staphylocoques de la viande cameline traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C

3.9.2.1.2. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C

Nous remarquons un même comportement des Lc. camelins et Lc. bovins .Ce comportement est différent de celui des Lc. caprins. Comme *dans* le cas des surnageants, la courbe obtenue avec le témoin se trouve toujours au-dessus des autres courbes (figure 34).

L'analyse statistique montre l'existence d'une différence significative ($p<0.05$) entre le nombre de Staph. et les differentes origine de Lc. ;

Le taux de*St.aureus*dans les viande traitées par des Lc.caprin*s* diminue de 6.21 Log ufc/g à J0 à 5.41 Log ufc/g à J0+1. Une augmentation de la concentration des Staph. est observée de 6.21 Log ufc/g à 6.40 Log ufc/g et 0 6.91 à J0+1 pour les Lc. camelins et bovins, respectivemt. Au-delà de J0+2, nous remarquons une diminution de la charge des bactéries contaminantes. Les concentrations passent en effet de 5.26,5.56 et 6.88 Log ufc/g à J0+2 à 5.04,5.27 et 5.81 Log ufc/g à J0+6 pour les Lc. caprins, Lc. camelins et bovins, respectivemt (ANNEXE 09). L'analyse statistique montre une différence non significative ($P<0.05$) entre l'action des surnageant et celle des Lc.

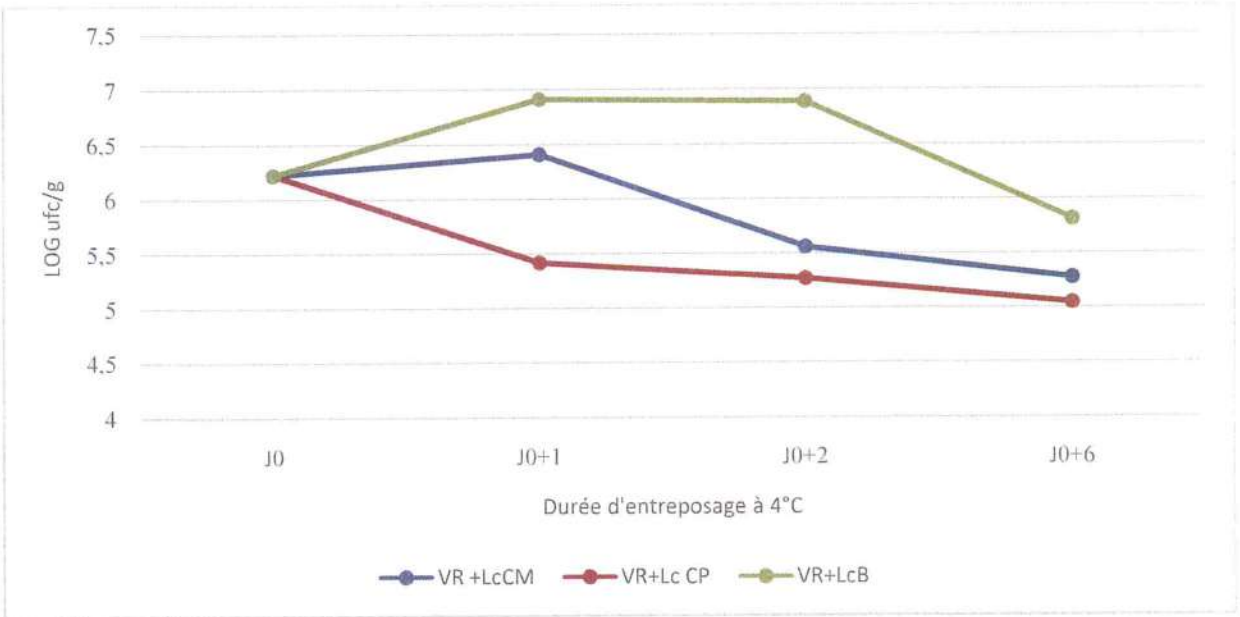

Figure 34 :Evolution des *Staph.* de la viande cameline traitée par une culture de Lc, durant l'entreposage à 4°C

3.9.2.1.3. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* de la viande cameline surcontaminée par une souche sélectionnée *St.aureus*ATCC 11778 et traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C

La figure 35 présente l'évolution des Staph. sur la viande cameline surcontaminée et traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4^0C.

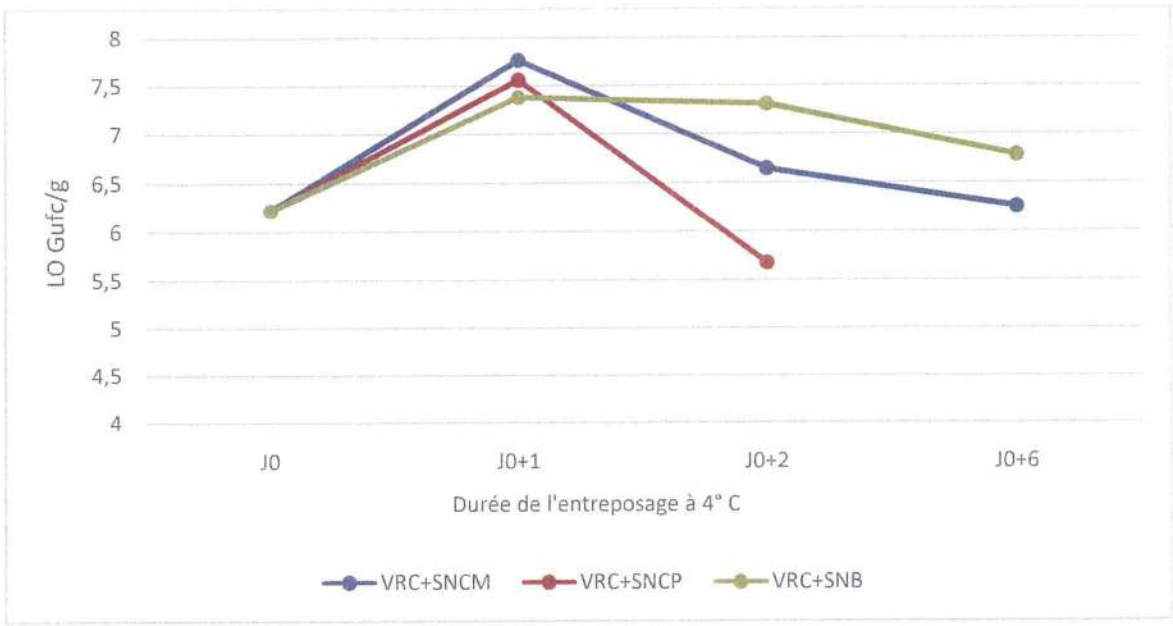

Figure 35 : Evolution desStaph.sur la viande cameline surcontaminée par *St. aureus* 11778 traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4^0C

L'allure des trois courbes est globalement similaire. On constate une augmentation du taux des *St.aureus*dans tous les cas de figure durant les deux premiers jours, ce qui était prévisible du fait que nous nous trouvons devant des souches sauvages et des souches sélectionnées. Ces taux passent de 6.21Log ufc/g à J0 à 7.37,7.55 et 7.76 Log ufc/g respectivement pour les SNB , SNCP,SNCM à J0+1. Au-delà de cette durée de stockage, nous assistons à une diminution de ce taux. Cette dernière est plus marquée dans le cas du SNCP. Elle est suivie de celle du SNCM puis de celle du surnageant témoin. En effet, nous avons enregistré des taux de Staph. egaux à 5.67, 6.64 et 7.30 Log ufc/g à J0+2 pour les SNCP, SNCM et SNB respectivement. A j0+6 le taux de Staph. diminue encore plus puisqu'il passe à 6.25 et 6.78 Log ufc/g, aucune colonie n'a été trouvé à J0+6 dans le cas du SNCP(ANNEXE 09). L'analyse statistique montre une différence significative ($p<0.05$) entre le nombre de cellule et la durée du stockage.

3.9.2.1.4. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus.* de la viande cameline surcontaminée par une souche sélectionnée *St.aureusATCC 11778* et traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C

La figure 36 l'évolution des Staph. sur la viande cameline surcontaminée traitée par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4°C .

Nous remarquons que l'allure générale des trois courbes est différente. Cependant, comme dans le cas des surnageants, la courbe relative au Lc. bovins se place toujours au dessus de celles des Lc. camelins et caprins avant J0+1. L'analyse statistique montre une différence significative ($p<0.05$) entre le nombre de Staph. et la durée de conservation. A J0+1, nous remarquons une augmentation de taux de Staph. de 6.21 Log ufc/g à J0 à 6.64 et 7.64 Log ufc/g sur les viande traitée par les Lc.camelins et les Lc.bovins respectivement. Pour les Lc.caprin, on constate une diminution de ce taux jusqu'à 5.54 Log ufc/g. Au-delà du deuxième jour de réfrigération (J0+1), la concentration cellulaire de la flore de contamination diminue et passe à 6.85 Log ufc/g dans le cas des Lc.bovins et reste à peu près stable avec les Lc. camelins. L'action antibactérienne des lactocoques caprins, bien que plus accentuée à J0+1, semble totalement inhibée au-delà de cette durée de stockage au point où on enregistre 7.18 Log ufc/g à j0+2. Le taux de Staph. diminue par la suite dans tous les cas de figure et atteint 6.50, 6.56 et 6.94 Log ufc/g à J0+6 pour les Lc. bovins, camelins et caprins respectivement (ANNEXE 09).

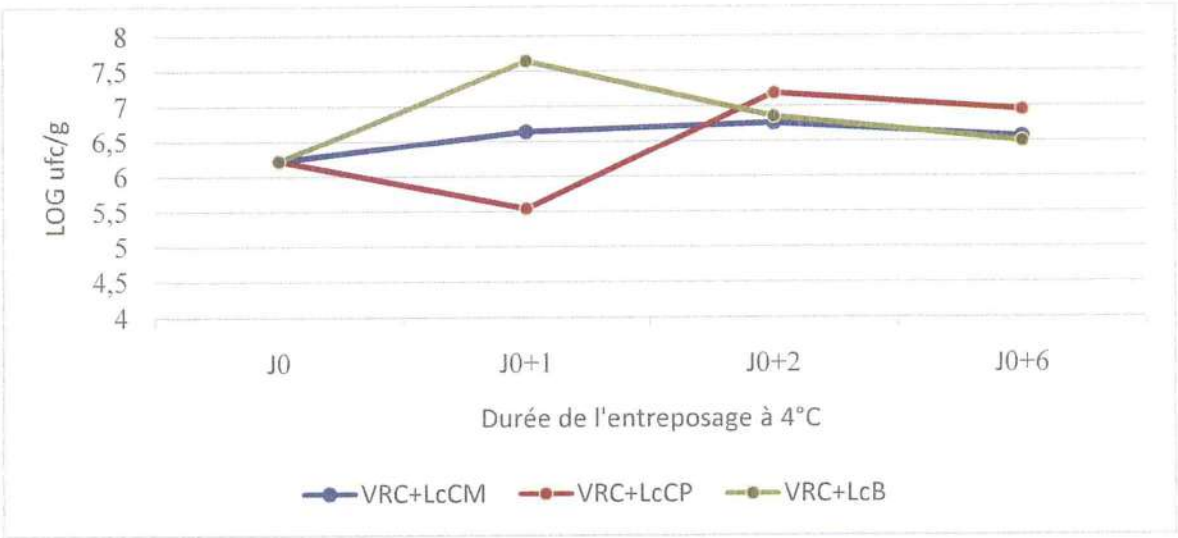

Figure 36: Evolution desStaph. sur la viande cameline surcontaminée par des *St.aureus ATCC25923*traitée par une culture de Lc., durant l'entreposage à 4°C

3.9.2.1.5. Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* du poulet traitée par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C

La figure37 présente l'évolution de souche sauvage de *St.aureus* du poulet traitée par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C

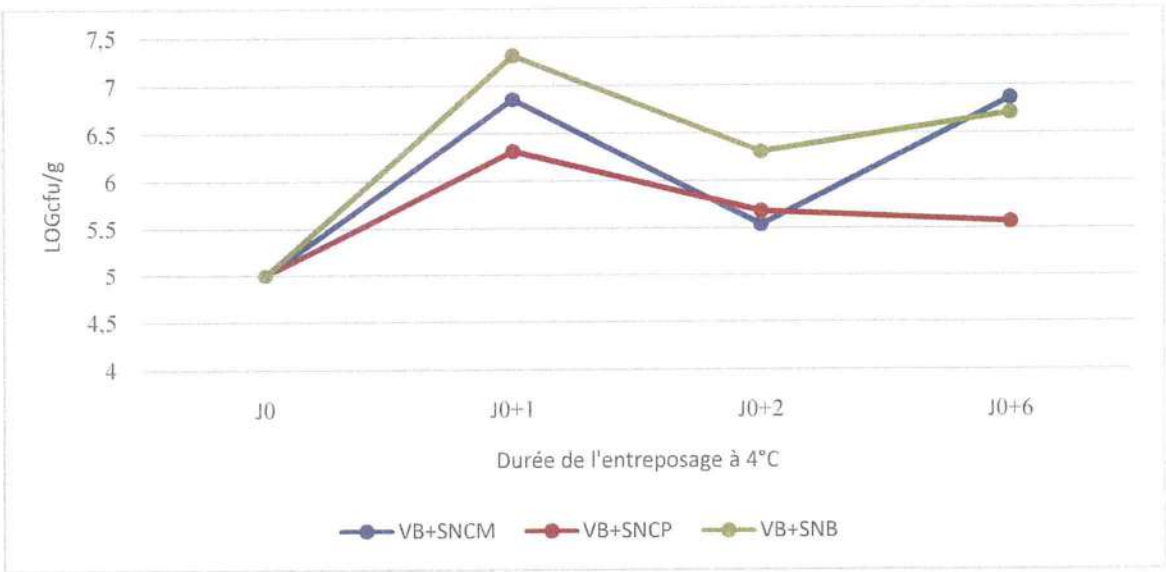

Figure 37: Evolution des Staph. Sur le poulet traité par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C

Nous remarquons que le comportement des trois surngeants est le même jusqu'à J0+2. A partir de J0+2 le SNCM se comporte de la même manière que le surnageant témoin. L'analyse statistique indique une différence tés hautement significative ($p<0.001$) entre le taux de Staph. et la durée du stockage.

Une augmentation du taux de Staph.est enregistrée à J0+1. Ce dernier passe de 5 Log ufc/g à J0 à 6.31, 6.85 et 7.31 Log ufc/g pour les SNCP,SNCM et SNB respectivement à J0+1. Nous constatons à J0+2 une diminution du taux des souches sauvages de Staph. qui passe à 5.53, 5.67 et 6.30 Log ufc/g. Au delà une recrudescence de ce taux sur la viande traitée par les SNCM et SNB (6.86 et 6.70 Log ufc/g respectivement) ; le taux diminue sensiblement dans le cas du SNCP (5.56 Log ufc/g) (ANNEXE 09).

3.9.2.1.6.Evolution de la souche sauvage de *St.aureus* du poulet traitée par les lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C

D'après la figure 38,on constate le même comportement des Lc. durant les deux premiers jours (J0+1). Ce comportement se traduit par une croissance des Staph. dont le taux passe de 5 Log ufc/g à J0 à environ 7.77 Log ufc/g à J0+1. Une diminution de ce taux est enregistrée à J0+2 (5.51, 6.23 et 6.38 pour les Lc. camelins, bovins et caprins respectivement). Au-delà de cette durée de réfrigération, on constate une recrudescence des souches jusqu'à 6.03 Log ufc/g dans le cas du traitement de la viande de poulet par les Lc.camelins . Pour les Lc. caprins et bovins une baisse de la concentration cellulaire est constatée (5.48 et 6.03 Log ufc/g respectivement pour les Lc.bovins et caprins) (ANNEXE 09). L'analyse statistique indique une différence très hautement significative ($p<0.001$) entre le nombre de Staph. et la durée de bioconservation.

L'analyse statistique montre par ailleurs une différence non significative ($p>0.05$) entre le comportement des Lc. et leur surnageants.

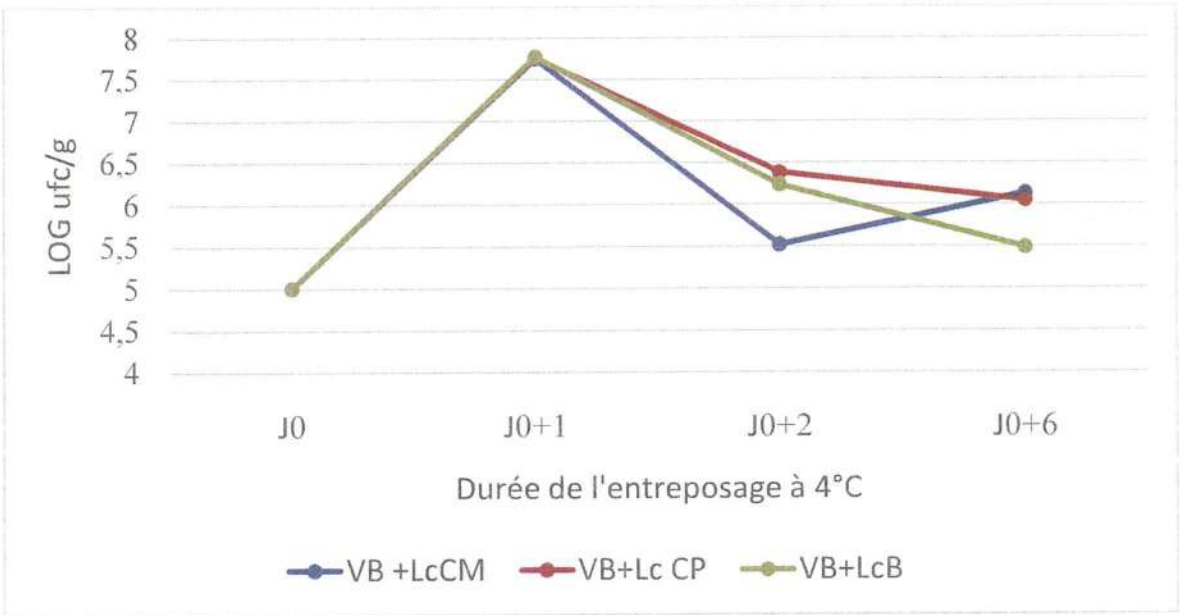

Figure 38 : Evolution des Staph.sur le poulet traité par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4 ° C

3.9.2.1.7.Evolution des *St.aureus* du poulet surcontaminé et traité par les surnageants durant l'entreposage à 4 ° C

La figure 39 présente l'évolution des Staph. sur le poulet surcontaminé, traité par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C . Nous remarquons que jusqu'au 2ème jour (J0+1), le taux d e *Staph.* augmente dans le poulet quelque soit l'origine du surnageant. Il passe de 5 Log ufc/g à J0 à 6.23, 6.57 et 7.37 Log ufc/g pour le SNCP , le SNCM et le SNCB respectivement. A partir de J0+1, ce taux augmente légèrement sur la viande traitée par le SNCM (6.76Log ufc/g) et diminue, en revanche sur la viande traitée par les SNB et SNCP (6.76et 6.03 Log ufc/g). A partir de J0+2, le SNCM et le SNCP semblent devenir inefficaces contre les *Staph.* (7.02 et 6.75 Log ufc/g respectivement), contrairement au SNB dont l'activité anti staphylocoques reste active jusqu'à J0+6 (6.56 Log ufc/g) (ANNEXE 09). L'analyse statistique indique une différence très hautement significative ($p<0.001$) entre le nombre de cellules et la durée de réfrigération du poulet.

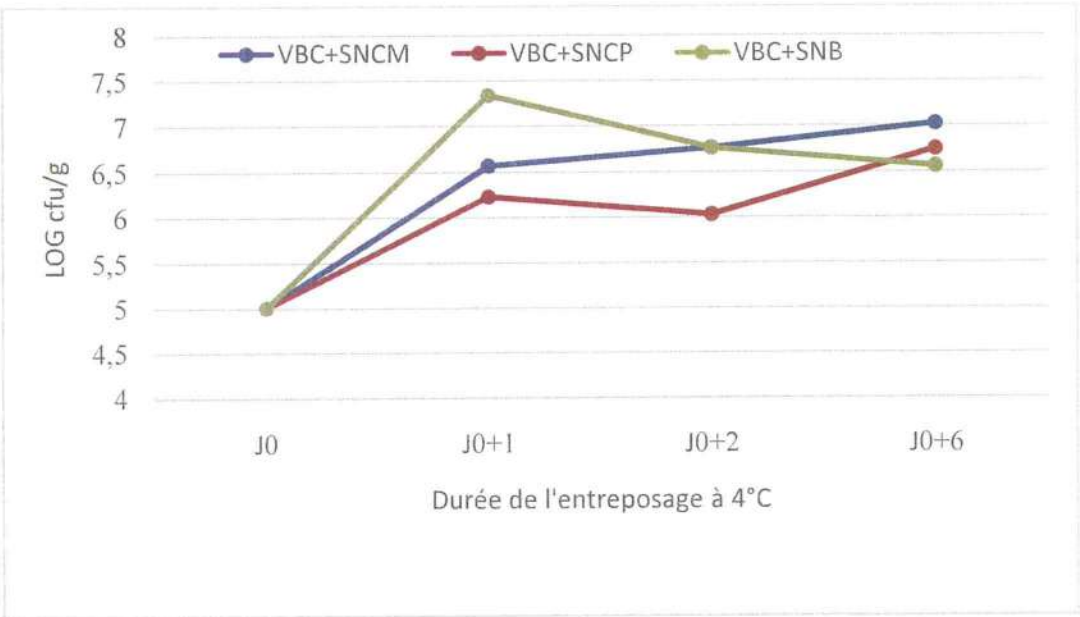

Figure 39 : Evolution de la souche cible du poulet surcontaminé par des *St. aureus ATCC25923*, traité par les surnageants, durant l'entreposage à 4 ° C

3.9.2.1.8. Evolution des *St.aureus* du poulet surcontaminé et traité par les Lactocoques durant l'entreposage à 4 ° C

La figure 40 présente l'évolution des Staph. du poulet surcontaminé, traité par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4 ° C . A travers la figure, on remarque que jusqu'à J0+1, le taux de Staph. augmente dans le poulet bioconservé (6.52, 6.63 et 7.77 Log ufc/g pour les Lc. camelins, caprins et bovin respectivement). Au-delà de J0+2 on remarque une diminution dans tous les cas de figure (6.19, 6.30 et 6.32 Log ufc/g pour Lc. camelins,caprins et bovins).Une augmentation pour les viandes traitées par les Lc. caprin (7.57 Log ufc/g)et diminue légèrement ou se stabilise dans le cas de la viande conservée par les Lc camelins et bovins(6.10 et 6.29 Log ufc/g respectivement) (ANNEXE 09) . L'augmentation de la charge staphylococciqueobservée dans le traitement de la viande cameline par les lactocoques caprins à partir de J_{0+2} (figure 40) rapproche l'activité du surnageant (figure 39) et celles des lactocoques caprins.

L'analyse statistique montre une différence hautement significative ($p< 0.01$) entre le nombre de cellules de staph. et la durée de l'entreposage.

L'analyse statistique montre par ailleurs une différence non significative ($p>0.05$) entre le comportement des Lc. et leurssurnageants.

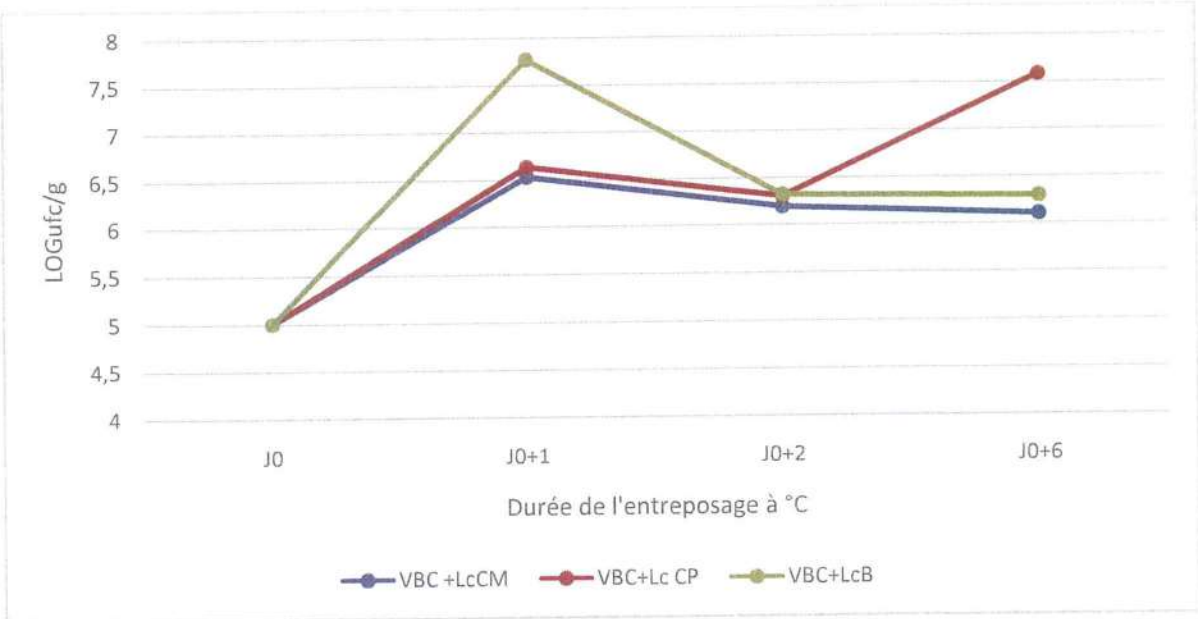

Figure 40 : Evolution des Staph. sur le poulet surcontaminé par des *St. aureus ATCC25923*, traité par une culture de Lc. durant l'entreposage à 4 ° C

D'après les résultats obtenus dans cette partie de l'étude, nous remarquons que les surnageants et les Lc. présentent une activité bactéricide presque similaire. Ce résultat est de nature à suggérer que la part de la bactériocine produite par l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* dans le système de défense contre les staphylocoques est importante. Cette hypothèse est confortée par les mesures prises au préalable pour éliminer les autres effets potentiels d'inhibition des staph. dans les surnageants de culture.

Globalement, l'activité anti- staphylococcique exercée directement (bactériocine contenue dans le surnageant) ou indirectement par les souches de Lc. caprins (production de bactériocine *in situ*) semble plus importance que celle exercée par les souches de Lc. camelines et leur surnageant. La souche bovine semble présenter des effets inhibiteurs moins intenses contre les Staphylocoques. Ces constatations expérimentales semblent corroborer les résultats des tests d'antagonismes qui ont révélé des zones d'inhibition plus apparentes avec le surnageant caprin (SNCP). Dans le même ordre d'idée, des travaux menés par MORETRO et *al.* (2000), ont montré qu'une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable.

D'une manière générale, une augmentation du taux de Staph. est observée durant les deux premiers jours (J0+1) de conservation des produits carnés expérimentaux. Cette augmentation est plus prononcée dans le cas des produits ayant été volontairement inoculés(surcontaminés) par la souche de *Staphylococcus aureus*ATCC25923, puis traités par les Lc. ou par leur surnageants. Cela est peut être du à une concentration moins importante de la population initiale des lactocoques inoculés aux viandes, par rapport à celle de la souche contaminanteet/ou aux paramètres de production de bactériocines. Dans ce contexte, MARTINEZ-CUESTA et *al.*,1999 et DORTU et THONART, (2008) rapportent que la production de bactériocines dépend principalement de la souche productrice, de la température, du pH et de la composition du milieu , de la souche cible, de la population cellulaire initiale , de la technologie de fermentation employée, de la concentration et de la pureté de la substance antibactérienne. Les conditions de culture restent toutefois les paramètres les plus influençables de la production de bactériocines. L'optimisation de la croissance d'une culture ne va pas nécessairement de pair avec celle de de la production de bactériocines (PARENTE et *al.*, 1999 ; HENG *et al.*,2007 ; SIBOUKEUR, 2013). Ces auteurs rapportent que la production de bactériocine peut croitre quand les cellules productrices subissent un stress nutritionnel ou environnemental. Il a même été suggéré que des conditions

de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (VERLUYTEN et *al.*, 2004). Les températures et pH optima de production sont souvent inférieurs aux températures et pH optima pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *L. curvatus* LTH1174 (MESSENS et *al.*, 2003), *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L. curvatus* L442 (MATARAGAS et *al.*, 2003), de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687 (MORETRO et *al.*, 2000), d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* DCE471 (DE VUYST et *al.*, 1996) et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (NEL et *al.*, 2001).

D'après DORTU et THONART,(2008) , la composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires etc...) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc...) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. Cette production étant souvent sous le contrôle d'un système de *Quorum Sensing*, la concentration en molécules inductrices doit être suffisante, son interaction avec la matrice alimentaire peut donc être un facteur limitant. La concentration cellulaire maximale atteinte dans le produit doit être inférieure à la limite de 10^6 ufc g^{-1} généralement admise pour les produits non fermentés.

En plus de cela lors d'une application alimentaire, la composition du produit est un des premiers facteurs pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité de la bactériocine de par son adsorption sur des composantes du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'activité inhibitrice dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température (GALVEZ et *al.*, 2007).Un autre facteur limitant l'activité des bactériocines est la flore autochtone, principalement sa concentration, la présence de bactéries résistantes, la présence de microorganismes produisant des protéases dégradant la bactériocine et l'état physiologique de cette flore. Un état physiologique stationnaire ou stressé ainsi que la formation de spores peut conduire à une résistance accrue. En outre, dans les produits solides, les bactéries forment des microcolonies ou des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (SCHÖBITZ et *al.*, 2003).

D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente favorable des aliments. Si celle-ci est sensible à la bactériocine, son déséquilibre

pourra conduire à la croissance de microorganismes résistants aux bactériocines, pathogènes et/ou altérants (les Staph. en l'occurrence), avec des conséquences sanitaires et/ou organoleptiques défavorables .Cet aspect n'a pas été jusqu'à l'heure actuelle rapporté par la littérature.

Tous ces phénomènes peuvent conduire à :

– Une absence totale d'activité antimicrobienne ;

– Une inhibition partielle des bactéries cibles ;

– Une diminution de la concentration initiale des staph. sous la limite de détectabilité suivie d'une reprise de croissance au cours du stockage, un phénomène appelé « rebond » ;

– Un effet inacceptable sur l'état sanitaire et/ou sur les qualités organoleptiques (BOUTTEFROY et *al.*, 2000 ; VIGNOLO et *al.*, 2000 ; SCHÖBITZ et *al.*, 2003 ; KOUAKOU et *al.*, 2008).

Dans le présent travail, le phénomène de rebond a été observé au-delà du 3ème jour (J0+2) de conservation dans la majorité des cas. Cela nous conduit à préconiser une limite de la durée de réfrigération des denrées carnées traitées directement ou indirectement par la bactériocine (type nisine).

Conclusion

Conclusion

Le lait renferme une microflore diversifiée et importante. Les bactéries lactiques, dont les lactocoques, sont connues pour leur caractère bactériocinogène notamment la production de nisine, la seule bactériocine utilisée comme conservateur (E234) dans l'industrie agro-alimentaire.

Dans la présente étude nous nous somme intéressé à l'isolement d'une souche *Lactococcus lactis sub sp lactis,* à partir du lait de deux espèces adaptées aux zones arides lait (chamelle et chèvre). Dans le but d'obtenir une biomasse importante, nous avons procédé à des essais d'optimisation des conditions de culture de cette dernière. Pour ce faire, deux milieux de culture : le M17 et le MRS et deux sources de carbone (glucose et fructose) à différentes concentration) ont été utilisées pour les enrichir. Deux périodes d'incubation (18heures et 24heures) ont été adoptées. Les résultats montrent que pour la souche de isolée à partir du lait camelin, le milieu M17 donne des concentrations cellulaires plus élevées quelque soit la source de carbone additionnée au milieu. La période d'incubation de 24 heures a toutefois permis l'obtention d'une biomasse plus importante. Quant 'aux souches isolées à partir du lait caprin, le milieu MRS a permis l'obtention d'une meilleure biomasse quelque soit la concentration en source de carbone ajouté et quelque soit le temps d'incubation utilisé.

La culture de la souche d'intérêt isolée suivie d'une séparation de la biomasse par centrifugation, nous a permis de récupérer le surnageant susceptible de contenir la bactériocine. Des tests d'antagonismes (puits, disques et spots réalisés) avec les surnageants camelin, caprin et bovin (témoin) contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923 sont réalisés. Les tests des disques ont révélé la présence de meilleures zones d'inhibition (ZI) le cas des SNCP. La nature chimique de cette substance contenue dans les surnageants obtenus a été confirmée par l'effet des traitements thermiques, celui du pH et celui de l'action de la pepsine sur l'activité antibactérienne. Les résultats ont montré que la substance antimicrobienne contenue dans le surnageant était thermostable, résistante à des pH acide et basique et à l'activité de la pepsine.

Après cela, nous avons procédé en l'optimisation des conditions de conservation des souches d'intérêt, par réfrigération (4°C) et par congélation (-20°C) en l'absence et en la présence de trois cryo- protecteurs (DMSO 5%, saccharose 12% ou le glycérol 15%) pour une

utilisation ultérieure (production de bactériocine). Le calcul des taux de survie des cellules, a montré que la congélation était plus efficace comparativement à la réfrigération en ce qui concerne les souches lactococciques camelines. L'utilisation de DMSO, du glycérol, ou de saccharose ne semblent pas améliorer la conservation. Donc la congélation sans cryoprotecteurs ou en utilisant l'un des cryoprotecteurs cités semble avoir le même résultat pour un entreposage de vingt jours à -20°C. Le meilleur taux de croissance est obtenu avec 12% de saccharose .

Enfin la biopréservation des denrées est une bonne alternative de remplacement des molécules « chimiques » et des traitements thermiques, souvent intensifs. Elle devrait permettre de répondre aux attentes des consommateurs qui souhaitent des produits « plus naturels ». Nous avons utilisé des surnageants et des cultures de Lc. camelin et caprin pour des essais de bio- préservation de deux types de viande les plus consommées localement, la viande cameline et du poulet contre des souches de *Staph.* sauvages et une souche sélectionnée (*Staphylococcus aureus* ATTCC 11778). La souche de Lc. bovins est utilisée à titre comparatif.

Les analyses préliminaires des viandes, cameline et de poulet ont montré des taux de germes supérieurs aux normes réglementaires, notamment ceux des *Staphylococcus aureus,* espèce contaminante et altérante des viandes aussi bien rouge que blanches. Nous avons remarqué que les surnageants et les Lc. présentent une activité inhibitrice presque similaire. Ce résultat est de nature à suggérer que la part de la bactériocine produite par l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* dans le système de défense contre les staphylocoques est importante. 'activité anti- staphylococcique exercée par la bactériocine contenue dans le surnageant caprin ou par les souches de Lc. caprins (production de bactériocine *in situ*) semble plus importance que celle exercée par les souches de Lc. camelines et leur surnageant. Concernant, la viande de poulet, des constatations similaires à celles relevées dans le cas de la viande rouge ont été enregistrées. D'une manière générale, une augmentation du taux de Staph. est observée durant les deux premiers jours (J0+1) de conservation des produits carnés expérimentaux. Cette augmentation est plus prononcée dans le cas des produits carnés surcontaminés par la souche de *Staphylococcus aureus*ATCC25923, traités par les Lc. ou par leur surnageants. L'activité inhibitrice s'exerce sur la flore totale de St. aureus dont elle abaisse le taux jusqu'à J0+2. Un phénomène de rebond est observé au-delà du 3ème jour (J0+2) de conservation dans la majorité des cas. Cela nous conduit à préconiser une limite de

la durée de réfrigération des denrées carnées traitées directement ou indirectement par la bactériocine (type nisine).

Enfin au terme de cette étude, nous pensons, qu'il serait intéressant :

-D'étayer l'étude sur l'optimisation des conditions de culture des souches de lactocoques en modifiant d'autres paramètres ;

- D'approfondir l'étude sur l'optimisation des conditions de conservation des souches de lactocoques (lyophilisation), en prolongeant la durée de l'entreposage ;

- De réaliser une optimisation de la production de cette bactériocine ;

- De purifier et caractériser cette substance antimicrobienne ;

- De tenter des essais d'utilisation de cette bactériocine en association avec d'autres substances ou d'autres moyens antagonistes, pour plus d'efficacité ;

- D'élargir ces essais de bioconservation à d'autres bioproduits potentiellement sujets à des contaminations et / ou à des altérations ;

- D'élargir les essais de bioconservation contre d'autres espèces bactériennes redoutables pour la santé humaine telle que *Listeria monocytogenes.*

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **GHADA I.A. et NOUR I.A.(2012).** Effect of Storage Time on Physical and Chemical Properties of Burgers MadeWith Different Amounts of Camel Meat. Procceding of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Developement.29th january-01st february.Muscat, Sultanante of Oman.

- **RAIYMBEK G., FAYE B., KONUSPAYEVA G. et KADIM I.T.(2012).** pH Measurement of Six Muscles of Bactrian Camels (*Camelus bactrianus)* From Kazakhstan . Procceding of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Developement.29th january-01st february.Muscat, Sultanante of Oman.

ABDELHADI O.M.A, BABIKER J. F.,HOCQUETTE B.et FAYE B.(2012). Some aspects of nutritive value of the dromedary camel(Camelus dromedarius)Procceding of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Developement.29th january-01st february.Muscat, Sultanante of Oman.

ABDEL-RAHIM A.G. (1987). The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelusdromedarius*) and goat (*Capra hircus*) milk. *World Rev. Anim. Prod*.. Vol 23.pp 9-11.

ABEE T., (1995). Pore-forming bacteriocins of $Gram^+$ bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett*.Vol129.pp 1-9.

ABU-TARBOUSH H. M. (1996). Comparision of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci..Vol* 79.pp 366-371

ABU-TARBOUSH H. M., AL-DAGAL M.M. and AL-ROYLI M.A. (1998). Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci*., vol 81, pp354-361.

AL HAJ O. A. *et al* KANHAL H.A.,(2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. International Dairy Journal 20 (2010). International Dairy Journal Ed Elsevier . vol 20 .pp811-821.

ALAIS C. (1984) Science du Lait ; Principe des Techniques Laitières. SEPAIC, Paris.

ALAIS C. et LINDEN G. (1997). Abrégé de Biochimie Alimentaire. Masson, 3ème Ed. Paris.

-AL-KHARUSI A. H., KADIM I.T., MAHGOUB O. et AL-MARZOOQI W.(2012).Effect of Feed Intake on Composition of the Arabian Camel (*Camelus dromedarius*) Muscles . Procceding of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Developement.29th january-01st february.Muscat, Sultanante of Oman.

ALLOUCHE F. N., HELLAL A. , LARABA A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Revue « Nature et Technologie ». n° 03. pp 13 - 20.

AL-MOHIZEA I.S., ABU-LEHIA I.H. and EL-BEHERI M. (1994). Bacterial growth pattern in pasteurized camel's milk. *Egypt. J. Dairy*. *Sci*., vol 22 .pp 243-252.

AMIOT J., FOURNER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R .et TURGEON H. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Dans : Sciences et Technologie du Lait, Presses internationales Polytechnique, Montréal, pp 1-73.

AMIOT, J. LAPOINTE-VIGNOLA, C.(2002). Science et technologie du lait: Transformation du lait Presses internationales. Polytechnique, Ed quebec. 600 p.

ANONYME 1 (2005). Journal EFSA 314. Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission concernant. L'utilisation de la nisine (E 234) en tant qu'additif alimentaire. Question numéro EFSA-Q-2005-031. Résumé d'avis Journal EFSA 314.

ANONYME 2 , (1990). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et Nutrition, 2, 23 p.

ANONYME 3. (1995). Ministère du commerce.Qualité et sécurité des produits. tome II. pp 2-10, 12-23, 24-30, 32-41, 64-79.

BADAOUI D. (2000). Contribution à la connaissance du lait de chamelle : essai de caractérisation de protéines par électrophorèse sur gel de poly –acrylamide (PAGE). Mémoire d'ingéniorat. Université de Ouargla.

BADIS A. ,LAOUABDIA-SELLAMI N ., GUETARNI D.,KIHAL M.,OUZROUT R .(2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia etKabyle ».Sciences et Technologie.pp 31-35 .

BALLA,(2011) .Contribution à la création d'un souchier camelin :Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée.Université Kasdi Merbah Ouargla.

BARBOUR E.K., NABBUT N.H., FRERICHS W.N. et AL NAKHLI H.M. (1984). Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk ; relation to whey lysozyme and stage of lactation. *J. Food Protect*.,Vol 47.pp 838-840.

BAYOUB K., ELOTMANI F., ASSOBHEI O., JAOUA S.,SOUKRI A. .(2006).Contribution à l'étude des bacteriocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raib » .congrés international de biochimie. Agadir

BAYOUMI S. (1990). Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *K. Milchwirtschaftlische Forsch.,* vol 42.pp 3-8.

BEAL C. ;MARTIN M. ;FONTAINE E. ;FONSECA F. et OBERT J.P.(2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques.In « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments ». Ed Corrieu G.et Luquet F.M. Lavoisier. Paris.pp 661-785.

BENAISSA A.,OUL ELHADJ A.,ADAMOU A., BABELHADJ B., (2015). Caractéristiques Microbiologique de la viande cameline conservée et traitée selon differnts modes.Revue des Bioressources.Vol 5.(1).pp 69-75 .

BENAISSA A.,OUL ELHADJ A.,ADAMOU A., BABELHADJ B., HAMMOUDI M.et RIAD A.(2014a). Qualité de la viande de dromadaire dans les abatoirs de Ouargla en Algérie.II.Contamination bactérienne superficielle des carcasses .Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.67.(4).pp 229-233

BENAISSA A .(2011). Etude de la qualité microbiologique des viandes camelines et ovines conservées selon differents modes.Mémoire de Magister en Biologie option Microbiologie Appliquée.Université Kasdi Merbah Ouargla.

BENAISSA A.(2015). Evolution des qualités physicochimiques, biochimiques et microbiologiques de la viande cameline au cours de son attendrissage et sa conservation selon différents modes.Thèse de doctorat en microbiologie Appliqueé. Université Kasdi Merbah Ouargla. 105 p.

BENAISSA A., A.,OUL ELHADJ A., BABELHADJ B. ,ADAMOU A., , HAMMOUDI M.et RIAD A.(2014b). Appréciation du degré d'hygiène de l'abatoir de Ouargla Algerie.Journal of Advanced Research in Science and Technology.vol 1.(2).pp101-106 .

BOUBEZARI M.T. (2010). Contribution a l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques su lait chez quelques races bovines,ovines et caprines dans quelques elevages de la region de Jijel.Mémoire de Magister en médecine vétérinaire.Université Mentouri Constantine.

BOUDJENAH S. , KADRI M., SIBOUKEUR O., MATI A. (2009). Etude de la composition minérale du lait de chamelle collecte dans le Sud-Est Algérien. Recueil des résumés. Séminaire international. Protection et Préservation des Écosystèmes Sahariens. Le 13,14 et 15 Décembre. Ouargla.

BOURGEOIS C.M. et LEVEAU J.Y.(1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires :Contrôle microbiologique.3ème ed.Technique et documentation . 523p.

BOURICHA M. (2011). La sélection des souches de Leuconostoc mesenteroides productrices de substances antimicrobiennes .Mémoire de magister en Microbiologie fondamentale et appliquée. Université D'Oran Es-Senia

BOUTTEFROY A. ET MILLIÈRE J.B.(2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of*L. monocytogenes* ATCC15313. *Int. J. Food Microbiol*., vol 62, pp 65-75.

BOYAVAL P., DEBORDE C., CORRE C., BLANCO C. et BEGUE E., (1999). Stress and smoprotection in propionibacteria. Le lait, vol 79 .pp 59-69.

BRULE G., LENOIR J.et REMEUF F. (1997). La micelle de caseine et coagulation du lait. In « Le fromage ».3ème ed. Coordinnateurs ECK A ., GILLIS J.C.Ed Tec etDoc. Lavoisier.Paris.886p.

ÇADIRC B.H.I et ÇITAK S. (2005). A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. Pakistan Journal of Nutrition 4 (4): pp 237-241. Asian Network for Scientific Information

CASTRO, R. NEVES A. R., FONSECA L. L., POOL W. A., KOK J., KUIPERS O.P. , SANTOS H. (2009). Characterization of the individual Glccose uptake systems of*Lactococcuslactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcUpermease. Molecular Microbiology .Vol 71(3) .pp 795–806.

CHAN W.C. ; BYCROFT B.W. ; LIAN Y. et ROBERTS G.C.K. (1989). Isolation and characterization of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin.vol 252 .pp 29-36.

CHEHMA A. (2003). Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique .Niamey 5-8 Novembre. Niger.

CHEIGH C.I., PARK H., CHOI H. J. et PYUN Y.R. (2005). Biotechnology Letters Ed Springer.vol 27. pp155–160.

CHEN Y.S.,SRIONNUAL S., ONDAT.,YANAGIDA F.(2007).Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria .Applied Microbiology.vol 45.pp190-193.

CHERFI M. (2003). Potentialités laitières des chamelles (*Camelus dromedaries)* de la population Sahraoui. Mémoire d'ingéniorat, Université de Ouargla

CHOI H. J., CHEIGH C. I., KIM S. B. ET PYUN Y. R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcuslactis* subsp. *lactis A164* isolated from Kimchi. Journal of AppliedMicrobiology vol , 88, pp 563-571.

CHRISTIEANS S.,DELBES-PAUS C.,DENIS C.,MONTEL.M.C. ,PREVOST H ,RIVOLLIER M .STAHL V.(2013) Mécanismes d'action in « Flores productrices pour la conservation des aliments » ;ed Quae .pp19-44

CONTRERAS A., CORRALES J.C. et SIERA D., (1993). Caprine interammamry infection :Quality of milk. Le lait, 73 (5-6).pp 485-488

CUQJ.L.(2007). Microbiologie Alimentaire: Les relations microrganismes/aliment/consommateurs.Département Sciences et Technologie des Industries alimentaires 4 ème année.Université Montpellier II.Sciences et Techniques du Languedoc.pp2-17.

DALACHE F.,BENMOUNA Z. ,ZADI-KARAM H.,KARAM N.(2012) . Optimisation d' un milieu de culture d'un lactobacille pour la production d'une bactériocine .Les 18èmes journées nationales de Microbiologie .Tizi Ouzou.Algerie

DAOUDI A.(2006). Qualité d'un fromage local a base de lait de chèvre. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaire. l'Univers ité Hassiba Ben-Bouali- Chlef.

DAOUDI L. (2000). Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcuslactis*ssp. *lactis*biovar. *diacetylactis* UL719. , Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.). Faculté des études supérieures.Université Laval .Canada

DAVIAU C., FAMELART M.H., PIERRE A., GOUDEDRANCHE H. et MAUBOIS J.L., (2000). Rennet coagulation of skin milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. Lait,vol 80 (4).pp 397-415.

DAVIES E.A. ;BEVIS H.E. ; POTTER R. ; HARRIS J. ; WILLIAMS *G.C. et* DELVES-BROUGTON G.(1998).Reascarch note: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. Letters in Applied Microbiology.vol 27 .pp 156- 187.

DE VUYST L., CALLEWAERT R. et CRABBE K., (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, vol142.pp817-827.

De VUYSTL. et LEROY F. ,(2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: production, purification, and food applications.J Mol Microbiol Biotechnol13.Kanger.pp194–199.

DE WIT.J.N.(1998). Nutritional and fonctional characteristics of whey proteins in food products.journal of draiy science, Elsevier.vol 81. Pp 597-608.

DE-BUYSER M.L.,et SUTRA L.(2005) . *Staphylococcus aureus*. In « Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments. Sous la direction de FEDERIGHI M.. Ed Economica .2ème ed.pp25-51.

DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. et ROSS P.(2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J*.. vol 16 .pp1058-1071.

DELLAGLIO F. ; DE ROISSART H. ; TORRIANI S. ; CURK M.C. ; JANSSENS D. (1994). Caracteristiques générale des bacteries lactiques in « Bacterie lactique » ,de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

DELVES- BROUGTON. J. (1990) .Nisin and its application as a food preservative.Journal of the society of dairy technologiy.vol 43 .pp73-76 .

DENIS C. ,CHAMPOMIER-VERGES MC., ZAGOREC M. TALON R, MICHEL V. (2013).Critères des microrganismes bioprotecteurs ;flores productrices pour la conservation des aliments ;ed Quae .pp7-17

derived from dromedary heavy-chain antibodies. *The EMBO Journal,vol* 17.pp3512-3520.

DESMAZEAUD M.J. et de ROISSART H. (1994). Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris

DIB H ., HAJJ SEMAAN E., MRAD R., AYOUB J., CHOUEIRY L., MOUSSA H. ET BITAR G.(2012). Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. Lebanese Science Journal, vol. 13,(1).

DIENG M .,(2001) . Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des lait caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Inter-états des sciences et médecine vétérinaires de Dakar. Universite Cheikh Anta Diop de DAKAR .

DIOP M.B.,DAUPHIN R. D. , TINE E. , NGOM A. , DESTAIN J. , THONART P.(2007). Bacteriocin producers from traditional food products.Biotechnol. Agron. Soc. Environ 11 (4).pp275–281.

DJADOUNI F. (2013). Evolution de l'actvité antimicrobuennes des isolats de bactéries lactiques et détermination de spectre d'action de leur peptide vis-à-vis des germes d'altération.Thèse de doctorat en microbiologie spécialité microbiologie alimentaire .Univ d'Oran Es Sénia. 234 p.

DJENANE D. , MARTINEZ L., BLANCO D. , YANGÜELA J.,BELTRAN J.A., RONCALESP.(2005). Effect of lactic acid bacteria on extention of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO_2- rich atmosphere. Braz. J. Microbiol. vol.36 . (4) .pp 405- 412.

DJENANE D.(2009) . Les perspectives naturelles pour la préservation de la viande.Revue Campus. Revue scientifique trimestrielle de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou vol 16.pp28-61

DJENANE D., YANGÜELA J., DERRICHE F., BOUARAB L.,RONCALES p. (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Nature and Technologie .n 7.pp53-61 .

DORTU ET THONART P .(2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires». vol.13(1).pp 143-154.

DOUMANDJI A., HELLAL A., SAIDI N., (2010). Purification de la bacteriocinea partir de *Lactobacillus acidophilus*11. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. vol 4(2).pp 25-47.

DROGOUL C. et GERMAIN H.(1998). La santé animale :bovins, ovins, caprins .Edition Educagri .345p.

DUHAIMAN A.S (1988). Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. Comp. Biochem. Phys., vol 91.pp793-796.

El SAYED I., EL AGAMY E.SA., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. and ASSAF R. (1992). Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy Res*., vol 59**.**pp169-175.

EL-AGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. et ASSAF R., (1996). Purification and characterization of Lactoferrin, Lactoperoxydase, Lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *Int. Dairy J*.. vol 6. pp129-145.

ELMOUALDI L., LABIOUI H. , BOUSHAMA L., BENZAKOUR A. , OUHSSINE M.,EL YACHIOUI M.(2008) activité bactéricide d'une souche de *lactococcus lactis* subsp. *cremoris* . Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, vol 147.pp 7-18.

ELRAMOUZ R., (2005), Etude des changements biochimiques post mortem dans le muscle des volailles .Contribution au déterminisme de l'amplitude de la diminution du pH.pp3 ,4.

FARAH Z. (1993). Composition and Characteristics of Camel Milk; review.*J. DairynRes*., vol 60. pp 603-626

FARAH Z. , ABDULKADIR O., ABDURAHMAN SH. (2004). Milk and meat from the camel: hand book on products and processing. vdfHochshuleverlag AG ander ETH Zürich. 230p

FAYE B. et MULATO O.C. (1991). Facteurs de variation des paramètres rotéoénergétiques, enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. *Rev. Elev.Méd. Vét. des Pays Trop*.. vol 44. pp 325-334.

FEURER C., CHRISTIEAN S.,RIVOLLIER M.,LEROY S.,TALON R.,CHAMPOMIER-VERGES M.,ZAGOREC M . ,DESMONTS M-H.(2013) . Application dans la filière des produits carnés in « Flores productrices pour la conservation des aliments » ;ed Quae .pp69-90

FILIPOVITCH, DJ. **(1954).**Etude sur les variations de la densité du lait de mélange, . Le lait vol34.pp 129-132.

GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R.L. et BEN OMAR N.(2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol*..vol 120 (1-2). pp51-70.

GARRY P., CHRISTIEANS S., CARTIER P.(2008) . Procédés de bio-préservation . 12E *JSMTV.*

GAUCHER,I. (2007). Cararctéristiques dela micelle de caséines et stabilité des laits :de la collecte des laits crus au stockage des laits UHT, thèse INRA /Agrocampus Sci. Tech. Lait et oeuf .Agrocampus Rennes.

GAUTIER M., ROUALT A., HERVE C., SOMMER P., LERET V., JAN G., FRASLIN J.M., PRECOT F. et COSTE A., (1999).Bacteriophages of dairy propionibacteria ; *Le lait, vol* 79 .pp 93-104.

GIRARDET J.M. , CODDEVILL B., PLANCK Y., S'I'RECKE G. ,CAMPAGNA S. ,SPKL G. et LINDEN G.(1995). Structure of glycopeptides isolated from bovine milk component PP3. Eur. J. Biochem.vol23.pp 939-946.

GNAN S.O. and SHEREHA A. M. (**1986)**. Composition of Libyan camel's milk. *Aust. J. Dairy Techn*..vol 41.pp 33-35.

GONG X. , VISSCHER L. A. M., NAHIRNEY D., VEDERAS J.C. , DUSZYKM. (2009). The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. Biochimica et BiophysicaActa 1788 .pp1797–1803.

GORBAN A.M.S. et IZZELDIN O.M. (1999). Study on cholesteryl ester fatty acids in camel milk lipid. *International J. Food Sci. Techn*.vol 34.pp229-234.;

GORBAN A.M.S.et IZZELDIN O.M.(2001). Fatty acids and lipids of camel milk and colostrum. International Journal of Food Sciences and Nutrition. vol 52.pp 283–287.

GRENIER D., MÉLANÇON D.IC., SC. M. , GOTTSCHALK M..(2004). Traitement des infections à *Streptococcus suis*. Des bactériocines pour remplacer les antibiotiques.Fédération des producteurs de porcs du Québec.Editeur Porc Québec.

GUATARNI H.(2013) . Effet antimicrobien des bactéries lactiques isol2s 0 partir des laits crus algerien sur la croissance de helicobacter pylori ; Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire et industrielles .univ d'oran. Es sénia . 276 p.

GUINANE C.M., COTTER P.D., HILL C. et ROSS P.(2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol*..vol 98. pp1316-1325.

GUIRAUD J.P.(2012). Microbilogie Alimentaire.Ed Dunod.Paris.651p.

GUIRAUD J.P.,(1998). Analyse du lait. Microbiologie alimentaire. Ed.duno.651p

HALLAL Z.(2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti oxydantes ce certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la Sardine(*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister en Biologie. Université Mouloud Mammeri.Tizi Ouzou. 120p.

HANNACHI S.(2008). Inhibition des bactéries indésirables par l'activité antimicrobienne des espèces de Leuconostoc isolées du lait cru de chèvre . Magister en microbiologie fondamentale et appliquée. Univerité d'Oran Es-Senia. 108p.

HASSAN A.A., HAGRASS A.E., SORYAL K.A. and EL–SHABRAWY S.A. **(1987)**. Physicochemical properties of camel milk during lactation period. Egyptian J. Food Sci., vol 15. pp1-14.

HAY J D., CURRIE R.W., WOLFE FH., et SANDERS E J., (1973), Effect of Post Mortem Ageing on Chicken Muscle Fibrils. J. Food Sci. vol38 .pp 981-986

HENG N. C. K., WESCOMBE P.A. , BURTON J.P.(2007).The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria.Bacteriocins: Ecology and Evolution .Ed. by M.A. Riley and M.A Chavan. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

HOLO H.FAYE T., BREDE D.A., NILSEN T., ODEGÂRD I., LANGSRUD T., BRENDEHAUG J., NES I.(2002). Bacteriocins of propionic acid bacteria. Lait vol 82 .pp59-68.

HUBALEK Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.Cryobiologie.Elsevier.vol46.pp 205-229.

HUGENHOLTZ J. et KLEEREBEZEM M.(1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol*.. vol 10(5).pp492-497.

HURST A. (1981) . Nisin. Advance in Applied Microbioly.Ed Elsevier.vol 27 .pp85-123.

JASNIEWSKI J..(2008) .Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe Iia. Thèse de doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaire . Université de Nancy . 155p.

JOERGER, M. C. et KLAENHAMMER, T. R. (1986), Characterization and purification of helveticin J and evidence for a choromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol..vol 167. pp 439-446.

JUILLARD U., FOUCAUD C., DESMAZEAUD M. et RICHARD J., (1996). Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis* .Le lait. vol 76 .pp 13-24.

JUNG G .(1991). Lantibiotic ribosomally synthésized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and αβdideshydroamino acids.Angewandte chemie.vol 30.pp 1051-1192.

JVIS B. et MAHONEY R .R. (1969) Inactivation of nisin b**y** α-chymotypsin. Journal of Dairy Science.vol 52(09).pp 1448-1450.

KAISER A.L. et MONTVILLE T.J.(1993). The influence of pH and growth rate on production of the bactériocin, bavaricinMN, in batch and continous fermentation.Journal of Applied Bactériology.vol 75(6).pp536-540.

KAMOUN M. (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la

KARAM H., KARAM N-E.(2006), Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de Lactococcus résistantes au sel. Tropicultura. vol 24(3).pp 153-156.

KERAMANE B.,2009. Effets antimicrobiens des Lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus* multi- résistant. Mémoire de magister en microbiologie appliquéé. Université de Béjaia.

KHASKHELI M., ARAIN M.A., CHAUDHRY S., SOOMRO A.H., and. QURESHI T.A. (2005). Physico-Chemical Quality of Camel Milk. Journal of Agriculture et Social Sciences. vol 1(2) .pp164–166.

KLAENHAMMER T.R., FREMAUX C. et HECHARD Y. **(1994).** Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques ; in " Bactéries Lactiques I"., de Roissard et Luquet, Tech. Doc., Lavoisier, Paris

KONINGS W., POOLMAN B., DRIESSEN A. J. M., SMID E.J., MOLENAAR D. (1994).Mécanismes du transport des nutriments dans les bacteries lactiques in « Bacterie lactique »,de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

KONUSPAYEVA G., FAYE B., SERIKBAEVA. (2003). Les produits traditionnels à base de lai de chamelle en Asie centrale. Atelier international sur le lait de chamelle en Afrique. actes de l'atelier. Niamey. Niger.

KOUAKOU P.,GHALFI H., DESTAIN J.,DUBOISDAUPHIN R.,EVRARD O.,THONARTP. (2008). Enhancing the antilisterial effect of *L. curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Sci*.. vol 80(3).pp640-648

LABIOUI H., ELMOUALDI L. , EL YACHIOUI M., OUHSSINE M.(2005).Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. vol 144. pp 237-250.

LABORDE D., TALMANT A., MONIN G., (1985), Activités Enzymatiques Métaboliques et Contractiles de 30 Muscles de Porc. Relations avec le pH ultime Atteint Après la Mort. Reprod. Nutr. Develop.vol 25.pp 619-628.

LACHANCE M. (2002). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* mjc15.Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (MSc.) . Université Laval.Canada . 91p.

LAMONTAGNE M. ;CHAMPAGNE C.P. ;REITZ-AUSSEUR J. ;MOINEAU S.,GARDNER N. ; LAMOUREUX M. ;JEAN J. et FLISS I.(2002). Microbiologie du lait in « Science et technologie du lait ».Transformation du lait.Prosses internationales.Polytechnique.pp 75-121.

LARPENT J.P. , COPIN M. P. , GERMONOVILLE A., JACQUET M. ,THETAS J. L.(1997a). Microbiologie du lait et des produits laitiers. in : «Microbiologie alimentaire » 1ère Ed. Laprent, tec. Doc., , Lavoisier, Paris.

LARPENT-GOURGAUT M. , MICHAUX O. , LARPENT J. P. , DESMASURES N. , DESMAZEAUD M. , MANGIN I. , MASSON F. ,MONTEL M.C. , TAILLIEZ P. (1997b). Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: «Microbiologie alimentaire ». 1ère Ed. Larpent, Tec. Doc.,., Lavoisier, Paris.

LAUWEREYS M., ARBABI-GHAHROUDI M., DESMYTER A., KINNE J., HÖLZER W., DE GERNST E., WYNS L. et MUYLDERMANS S. (1998). Potent enzym inhibitors

LE GRAET Y. et BRULE G., (1993). Effects of pH and lonic strength on distribution of mineral salts in milk. *Le lait.* vol 73 (1).pp 51-60.

LE LAY C. (2009). Mise en évidence et caractérisation *in vitro* de l'activité antifongique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diactylactis*UL *719*, sur *Candida albicans.* Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.).

Faculté des études supérieures. Université Laval .Canada.
LEAL-SANCHEZ M.V., JIMENEZ-DIAZ R., MALDONADO-BARRAGAN A., GARRIDO-FERNANDEZ A. ET RUIZ-BARBA J .L.(2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of Lactobacillus plantarum LPCO10. Appl Environ Microbiol. vol 68(9).pp 4465-4471.

LEHNINGER A. L.(1981). Biochimie bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème Ed, Flammarion médicine-science.

LEROY F.,VERLUYTEN J. ET DE VUYST L.(2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int J Food Microbiol. vol 106(3) .pp70-85.

LUCHANSKY J.B. et CALL J.E.(2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. J. Food Prot.. vol 67. pp1017-1021.

LV W, ZHANG X, CONG W. (2005) . Modelling the production of nisin by Lactococcus lactis in fed-batch culture. Appl Microbiol Biotechnol. vol 68(3).pp 322-326.

MADIGAN M., MARTINKO J. (2007). Biologie des microorganismes. Edition Pearson éducation, 11ème édition., Paris . pp145-146

MAHBOUB N. (2010). Contribution à l'amélioration de la fromageabilité du lait camelin : Étude des conditions de conservation des enzymes gastriques camelines(type présure).Mémoire de magister en biochimie et analyse des bioproduits. Université Kasdi Merbah Ourgla.

MARCHAL N., OBRE A., BUTTION R., BOUDON J.L. et RICHARD C.L. (1982). Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris

MARTÍNEZ-CUESTA M. C.,PELAEZ C.,JUAREZ M.et REQUENA T.(1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and*Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin.International Journal of Food Microbiology. Vol 38.pp 125-131.

MATAMOROS S.(2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid .Thèse de Doctorat . Spécialité : Microbiologie .Université de Nantes.Faculté des Sciences et Techniques.

MATARAGAS M., METAXOPOULOS J., GALIOTOU M.et DROSINOS E.H.(2003). Influence of pH and temperature on bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. Meat Sci..vol64.pp265-271.

MATHIEU J. (1998). Initiation à la Physico-Chimie du Lait. Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris

MATI A. (1992). Les protéose–peptones dans les laits bovin ovin et caprin : Isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Thèse de Doctorat en Biochimie appliquée, Université de Nancy 1, France

McAULIFFE O. et HILL C.(2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol. Rev. . vol 25. pp285-308.

MEDJOUR A. (2014). Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semiintensif).Mémoire de magister en biologie .Université Mohamed Khider de Biskra. 125p.

MEHAIA M.A. (1993). Fresh soft white cheese (Domiati type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation. *J. Dairy Sci*..vol 6.pp 2845-2855.

MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. and EL-MOUGY S.A. (1995). Milkcomposition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chem*. . vol *52*. pp115-122.

MERZOUK,(2015). A procédé à une optimisation des conditions de fermentations et de préservation du lait cru de chamelles par des bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress. Thèse de doctorat en microbiologie et hygiène alimentaire .Université d'Oran. 126p.

MESSENS W., VERLUYTEN J., LEROY F. et DE VUYST L.(2003). Modelling growth and bacteriocin production by *L. curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. Int. J. Food Microbiol.. vol 81.pp 41-52.

METLEF S., DILMI-BOURAS A. (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Revue Nature et Technologie. n° 01. pp 33 - 44.

MIETTON B., DESMAZEAUD M., DE ROISSARD H. et WEBER F. (1994). Transformation du lait en fromage; in : « Bactéries lactiques II ». de Roissart et Luquet, Tech. Doc., Lavoisier, Paris.

MOHAMED H.K. et MANAL Y.I.(2012). Comparative chemical composition and quality attributes of Camel Meat and beef. Procceding of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Developement.29th january-01st february.Muscat, Sultanante of Oman.

MORETRO T., AASEN I.M., STORRO I. ET AXELSSON L.(2000). Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. J. Appl. Microbiol.. vol 88(3).pp 536-545.

MORRISON W.R.,(1968). Fatty acid composition of milk phospholipids.Lipids. vol 3. pp107-110.

MOUALEK I.(2009). Caractérisation du lait de chèvre collecté localement :séparation chromatographiques et controles élévtrophorétiques des protéines.Mémoire de Magister.Université Mouloud Mammri.Tizi Ouzou

NEL H.A., BAUER R., VANDAMME E.J. et DICKS L.M.(2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol..vol* 91.pp 1131-1138.

NES I .F., DIEP D.B., HÅVARSTEIN L.S., BRURBERG M.B., EIJSINK V., HOLO H.(1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. vol 70(2-4).pp113-28.

NES I. F,HOLO H. FIMLAND G., HAUGE H. H., ET NISSEN-MEYER J.,(2002). Unmodified Peptide-Bacteriocins (Class II) Produced by Lactic AcidBacteria. Peptide antibiotics: discovery, mode of action, and application. Ed Marcel Dekker.

NEVES A. R., WIETSKE A. P., KOK J., KUIPERS O. P., SANTOS H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR.Elsevier .FEMS Microbiology Reviews vol 29 .pp 531–554.

NISSEN-MEYER J., HOLO H., HAVARSTEIN L. S., SLETTEN K. AND NES I. F. (1992). A Novel LactococcalBacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *J. bacteriol.*, vol 174(17).pp5686 – 5692.

NOUT R..HOUNHOUIGAN J.D. et BOEKEL T.V.(2003). Les aliments, transformation, conservation et qualité. .backhuys publishers, leiden, the netherlands . 279 p.

NYKÄNEN A.; LAPVETÄINEN A.; HIETANEN R.M.; KALLIO H. (2000). Applicability of lactic acid and nisin to improve the microbiological quality of coldsmoked rainbow trout.Bibliomer n°11. Thème: 2 Transformation**.** Sous-thème :2 – 2.

OLEIVERA A. P. , NIELSEN J., FORSTER J., (2005). Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model.BMC Microbiology.vol 5. 39p.

ONER M.D. et ERIKSON L.E.(1986). Anaerobic fermentation of Lactobacillus bulgaricus and Steptococcus thermophilus on 3% non fat dry milk pur and mixed cultur .,Biotechnology Bioengeneering.vol28.pp 883-894 .

ÖZKALP B., ÖZDENB., TUNCER Y., SANLIBABA P., AK ¸CELIK.(2007). Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey .Lait. vol 87 .pp 521–534.

PAQUET D., ALAIS C. et AUBERT F..1982.Purification et quelques caractéristiques moléculaires du " composant-3 " des protéose-peptones.Le lait. Draiy science and technology. vol 62.pp 338-349.

PAQUET D.1989 Revue bibliographique : la fraction protéose-peptone du lait. *Lait,*

PARADA L. J., CARON C. R., BIANCHI A. MEDEIROS P. et SOCCO C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. Brazilian archives of biology and technology. vol.50(3). pp 521- 542.

PARADAL M.(2012) . La transformation fromagère capfine fermière bien fabriquer pour mieux valoriser ses fromages de chèvre. Ed Tec et Doc. Lavoisier. Paris .295p.

PARENTE E. ET RICCIARDI A.(1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol.. vol 52. pp 628-638.

PATTON G.C. et VAN DER DONK W.A.(2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. Curr. Opin. Microbiol.. vol 8.pp543-551.

PIARD J.C., MURIANA P. M., DESMAZEAUD M. J.et KLAENHAMMER T. R. (1992). Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine- Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcuslactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Applied and Environmental Microbiology. vol 58. pp 279-284.

RAHAL K. (1984).*Staphylocoques pathogènes* : « Résistances aux antibiotiques ». Office des publications universitaires. Alger.

RAIMBIAULT M. (1995). Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc**.** Transformation Alimentaire du Manioc. Éd AgborEgbe T., Brauman A.,Griffon D., Trèche S**,** éditions ORSTOM.

RAJARAM G., MANIVASAGAN P., THILAGAVATHI B., SARAVANAKUMAR A. (2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology .vol 2 . (2).pp 138-144.

RALPH W. J., JOHN R. T., et BIBEK R. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria microbiological reviews. vol. 5. pp171–200.

RAMET J. P. **(2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 Novembre.Niamey, Niger.

RAMET J.P. (1993). La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113p.

RAYNAL K. et REMEUF F., (2000). Effect of storage at 4 degrees C on the physicochemical and renneting properties of milk : a comparison of caprine, ovine and bovine milks. Journal Dairy Res. *vol* 67 (2). pp199-207.

RAYNAL-LJUTOVAC K., BARRAL J. , GABORIT P. , GUILLET I. , BOIVIN J. , DE CREMOUX R. ,BEUVIER E. , POUTREL B.(2008). Inhibition naturelle de la croissance de *S. aureus* dans les fromages au lait cru de chèvre. Renc. Rech. Ruminants.vol15.pp114-115.

REMEUF F., LENOIR J. ET DUBY C. (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure .Lait.vol 69 .pp 499-518.

RILEY M. A. et WERTZ J. E.(2002) . Bacteriocins: Evolution, Ecology,and Application. Copyright.Annu. Rev. Microbiol.N°.56.pp117-137.

RODGERS S., (2004). Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends Food Sci. Technol*. vol 15. pp366-372.

ROLLEMA H.S. ,KUIPERS O.P. , BOTH P. ,DE VOS W.M. et SIEZEN R.J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Applied and Environmental Microbiology.vol 61. pp 2873-2878.

RONGNE P. , HAUEN C., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., PER EUGEN K.,(2009). Three dimentional structure of two peptide bacteriocinplantaricin J K. Peptides. Elsevier .vol 30 .pp1613–1621.

RYAN, M. P., MEANEY, W. J., ROSS, R. P. et HILL, C. (1998), Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*.vol 64. pp 2287-2290.

RYAN, M. P., MEANEY, W. J., ROSS, R. P. et HILL, C. (1998), Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*.vol 64.pp2287-2290.

SAPATNEKAR N. M., PATIL S. N. et AGLAVE B.A..(2010). Extraction of Bacteriocin and Study of Its Antigonastic Assay . International Journal of Biotechnology and Biochemistry.vol 6. pp865–870.

SAWAYA W. N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A. MOHAMMAD H. (1989). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci*.vol 49.pp744-747.

SBOUI A., KHORCHANIT., DJEGHAM M. et BELHADJO. (2009) . Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. Afrique science .vol 05(2) .pp 293 – 304.

SCHILLINGER et LUCKE.1989. Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat. Applied and Environmental Microbiology. Vol55.(8). American Society for Microbiology.

SCHÖBITZ R., SUAZO V., COSTA M. et CIAMPI L.(2003). Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.v*ol 84.pp 237-244.

SHARMA S., GARG A.P., SINGH G.,(2010). Optimization of fermentation condition by lactoctococcus*lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. Journal of Draiy science.Vol 5 (1).pp1-9.

SIBOUKEUR (2011), Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis subsp lactis*, isolée à partir du lait camelin.Mémoire de magister en biologie .option microbiologie appliquée.Université Kasdi Merbah Ouargla.113p.

SIBOUKEUR A. et SIBOUKEUR O. *(*2013).Effect of cameline Nisin isolated from Lactococcus lactis subsp lactis on Staphylococcus aureus sp.Emirate Journal of Food and Agriculture.vol 25. 5.pp398-402.

SIBOUKEUR O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques.Institut National Agronomique El-Harrach-Alger.135p.

SIBOUKEUR O., MATI A. et ABIDI K. (2002). Caractéristiques physicochimiques et nutritionnelles du lait de chamelle. Congrès International sur «l'écodéveloppement dans les pays arabes », 26-28 mars, Assiut, Egypte.

SIMATOS D. , BLOND G. , LE MESTE M. et MORICE M.(1994). Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation. in « Bacterie lactique ». de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.pp 555-573.

SMAIL R. (2002). Isolement et caractérisation des protéines majeures du lait de chamelle collecté dans les régions de Ouargla et de Tamanrasset. Mémoire de Magister en BIOCHIMIE et Microbiologie. U.A.M. DE Bejaia.74 p.

SORENSEN E.S. et PETERSEN T.E. (1993). Phosphorylation, glycosylation and amino acidssequence of component PP3 from fraction of bovin milk. *J.Dairy Res.*vol 60.pp535-542.

SOUID W.(2011) .Effect des bactériocines(type nisine) prosuites parbdes souches isolées à partir du fromage camelin sur une souche psychrotrophe.Mémoire de magister.Université Kasdi Merbah Ouargla. 69p.

SOUID W.,BOUDJENAH- HAROUN S. ,SIBOUKEUR O.,MATI A. (2015) .Potential use of the nisin produced by lactic acid bacteria for longer conservation of camel chesse.Emirate Journal of Food and Agriculture. vol 27 .(10) .pp784-789

STILES M.E. et HOLZAPFEL W.(1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*.vol 36(1).pp 1-29.

TEUBER M. et GEIS A. (2006). The Genus Lactococcus. In « The prokaryotes » 3ème Edition. A hand book of biology of bacteria. Ed Springer. New York.pp205-228.

THOMPSON J. et GENTRY-WEEKS C.R. (1994). Métabolisme dessucres par les bacterieslactiqiues. in « Bacterie lactique »,de Roissard et Luquet, Tech.Doc.,

TODOROV S. D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*– production, genetic organization and mode of action. Brazilian Journal of Microbiology .vol 40.pp 209-221.

TRIAS R., BAÑERAS L., BADOSA E., MONTESINOS E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. Journal of Food Microbiology. vol 123.pp 50–60.

VAN DER MEER J.R . , POLMAN I. ,BEETHUPEN M.M. , SIEZEN F.U. ,KUIPERS O.P. et DE VOS W.M.(1993). Choracterization *of* the L***actococcus*** *Iaccis* nisin A operon genes nis P, encoding a substilisin-like serin protease involved in precursor processing. and nis R, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. J Bacterioly.vol 175. pp 2578-2588 .

VAUGHAN, E. E., DALY, C. et FITZGERALD, G. F. (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol*.vol 73. pp299-308.

VENEMA, K., CHIKINDAS, M. L., SEEGERS, J. F. M. I., HAANDRIKMAN, A. J., LEENHOUTS, K. J.; VENEMA, G. et KOK, J. (1997), Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic Bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.v*ol 63.pp 305-309.

VERLUYTEN J., LEROY F. et DE VUYST L.(2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus*LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol*..vol 70.pp 5081-5088.

VIGNOLA C.L., MICHEL J.C., PAQUIN P., MOINEAU M., POULIOT M. et SIMPSON R.,(2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Techniques et documentation .Lavoisier. 600p.

VIGNOLO G. M., DE KAIRUZ M.N.,DE RULZ HALGADO A. A.P. et OLIVER G.(1995). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by Lactobacillus casei CRL 705. Applied Bactériology. vol 78. pp5-10.

VIGNOLO G. ,PALACIOS J. ,FARÍAS M.E., SESMA F.,SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W.,OLIVER G.(2000).Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol*..vol 41.p p410-416.

WANGOH J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998). Composition of Milk from 3 Camels *(Camelus dromedarius*) Breeds in Kenya during Lactation. *Milchwissenschaft. v*ol 53.pp 136-139.

WARDANI A. K., EGAWA S., NAGAHISA K. SHIMIZU H., SHIOYA S.(2006). Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcuslactis* .Biochemical Engineering Journal 28 pp 220–230. Ed Elsevier.

WOLFF R.L. et FABIEN R.J., (1998). Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matièregrasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Le lait, v*ol 69.pp 33-46.

XIE L. ET VAN DER DONK W.A.(2004). Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol*..vol 8(5).pp 498-507.

YAGIL, R., ZAGOSKI, O., VAN CREVELD, C. 1998. Science and camel's milk production: some keys for nutrition and marketing. Actes du colloque : « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994, Collection Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 79-86**YAKHLEF H., (1989)**. La production extensive de lait en Algérie.*CIHEAM.Optionsmediterraneennes*- SerieSeminaires – N° 6 .pp 135-139.

YATEEM A., BALBA MT , AL-SURRAYAI T , MUTAIRI B, AL- DAHER R,(2008). Isolation of lactic bactéria with probiotic potentiel from camel milk. International jornal of Dairy science . vol 3(4).pp194-199.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 :Composition du M17

La composition est (g/l)(LARPENT*et al.* ,1997):

- peptone de soja 5
- peptone de viande 2.5
- peptone de caséine 2.5
- Extrait de levure 2.5
- Extrait de viande 5
- lactose 5
- Acide ascorbique 0.5
- Glycérophosphate de sodium 19
- Sulfate de magnésium 0.25
- Agar 15
- eau distillée 1000 ml

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°C.

Annexe 2:Composition du bouillon MRS(g /l)

- Peptone 10
- Extrait de viande 8
- Extrait de levure 4
- Glucose 20
- Acétate de sodium trihydraté 5
- Citrate d'ammonium 2
- Tween 80 1 ml
- Hydrogénophosphate de potassium 2
- Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2
- Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05
- pH = 6.2

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°C.

Annexe 3 : Composition de milieu de conservation(LARPENT,1997)

- peptone 10
- NaCl 5
- Extrait de viande 3
- Extrait de levure 5
- Glucose 1
- Na2HPO4 ‘
- Eau distillée 1l

Le milieu est stérilisé 15 minutes à 121°C.

Annexe 4 : Composition du milieu Baird Parker (g /l)(GUIRAUD ,2012)

- Tryptone 10
- Extrait de viande 5
- Extrait de levure1
- Chlorure de lithium5
- Gélose 20
- Sulphamézathine de sodium à 0.2%(facultatif)

pH7 .Autoclaver 15minutes à 120°C.

Annexe 5 : Composition du milieu PCA (g /l) (GUIRAUD ,2012)

- Tryptone: 6,0
- Extrait De Levure:2,5
- Glucose:1,0
- Agar:15,0
- Eau distillée 1l

pH7 .Autoclaver 15minutes à 120°C.

Annexe 6 : Acidité Dornic

1. Réactif

- Solution d’hydroxyde de sodium(NaOH) : solution titrée (0.11N) soude Dornic.1 ml de cette solution correspond à 0.01g d’acide lactique. Elle peut être préparée en diluant à 1000 ml, 111ml de solution d’hydroxyde de sodium 1N.
- Phénolphtaléine : solution à 1g dans 100ml d’éthanol à 95-96%

2. Appareillage :

-matériel courant de laboratoire :

- Burette graduée en 0.05 ml ou0.1ml
- Erlenmeyer 100ml
- Pipette de 10 ml
- Balance de précision

3. Mode opératoire

- Dans un erlenmeyer introduire 10 ml de lait (ou peser 10g de lait à 0.001g près)
- Ajouter 0.1ml de la solution de phénolphtaléine
- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au virage au rose. On considère que le
- virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes (AFNOR , 1980 in ABIDI,2001.)
- -acidité normale : 15 à 17° D pour un lait cru (GUIRAUD,1998)
- 14 à 16°D pour un lait pasteurisé acidité augmentée (fermentation lactique ou addition de K2Cr2O7)
- 26°D : lait coagulant par chauffage
- 70°D : lait coagulant à température ordinaire

-acidité diminuée (addition de NaHCO3 ou Na2CO3)

4. Expression des résultats

L'acidité est exprimée en grammes d'acide lactique par litre du lait

A= 10 x V1/Vo

Vo : volume de lait de la prise d'essai, en ml

V1 :volume de la solution d'hydroxyde de sodium en ml

A/ Acidité

Si l'on veut exprimer l'acidité en degré Dornic (D° on multiplie le volume de la solution d'hydroxyde de sodium (0.11N) par 10 (A= 10 x (10xV1)/Vo)

Annexe7 : Test de la réductase

1.Réactif

- Bleu de méthylène 0.5%

2.Appareillage

- Bain marie à 37°C
- 10 tubes à essais munis de bouchon
- Bêcher 100ml
- Pipette de 10 ml

3. Mode opératoire

- Dans un tube, mettre 1 ml de la solution de bleu de méthylène 0.5% dans 10 ml de lait cru
- Agiter le tube manuellement
- Placer le tube dans un bain marie à 37°C
- Noter avec précision le temps de cette immersion. Le niveau du bain marie doit être supérieur à celui du lait dans le tube.
- Suivre la réaction toutes les demi-heures. Les tubes décolorés sont retirés et le temps d'apparition de la décoloration doit être noté. Ceux dont le contenu reste bleu sont retournés une seule fois chaque demi- heure et soumis à une incubation plus prolongée jusqu'à disparition de teinte bleutée. Il persiste souvent une zone colorée au contact du lait avec l'air ;
- ne pas en tenir compte pour l'interprétation (LARPENT *et al.*,1997a).
- Selon LARPENT *et al*.,(1997 a), on peut approximativement estimer les résultats du test de bleu des méthylène de la façon suivante :

Décoloration en	**Nombre de bactéries/ ml**	**Qualité du lait**
5 heures ou plus	100 000-200 000	Bonne
2 à 4 heures	200 000à 2 millions	Bonne à passable
Moins de 2 heures	2 à 10 millions	Insuffisante

Nombre de germes/ ml Qualité du lait

La réfrigération du lait à la ferme, son transport en citernes isothermes obligent à modifier la technique recommandée ci-dessus. Le maintien du lait des températures voisines de + 4°C

pendant 1à 2 jours prolonge considérablement la durée de réduction des colorants. Il valorise l'interprétation de la qualité bactériologique du produit qui, en fait, n'est pas toujours meilleure. Il est donc conseillé de soumettre les laits réfrigérés à une préincubation à +13°C durant 18 heures avant de pratiquer la recherche du temps de réduction du bleu de méthylène.
Le tableau ci- dessous représente les résultats obtenus qui se rapproche davantage de ceux obtenus avec les laits crus non refroidis (LARPENT*et al.*,1997).

Durée de décoloration en heures	**Nombre de germes / ml**
5 heures	12 à 20.000
4 heures	30 à 50.000
2 heures	1 à 2 millions
1 heure	6 à 10 millions

Annexe 08

Conservation des souches camelines

Jours / Méthodes de conservation utilisées	J0	J0+2	J0+4	J0+6	J0+8	J0+10	J0+12	J0+14	J0+16	J0+18	J0+20
	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml
Réfregiration	4,08	3,78	3,59	3,40	2,98	3,29	2,77	3,64	3,58	3,30	3,27
cong.S cryo.	4,58	4,63	4,63	4,38	3,84	3,96	4,25	4,76	4,62	4,52	4,47
cong sacch.;	4,58	4,76	4,67	4,02	4,48	3,90	4,62	4,72	4,74	4,67	4,64
Cong; gly;	4,58	3,09	4,07	3,85	4,12	4,13	4,09	4,47	4,24	4,20	4,30
Cong: DMSO	4,58	4,58	4,56	4,64	4,13	3,84	4,43	4,70	4,70	4,63	4,64

Conservation des souches caprines

Jours / Méthodes de conservation utilisées	J0	J0+2	J0+4	J0+6	J0+8	J0+10	J0+12	J0+14	J0+16	J0+18	J0+20
	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml	clx10^5/ml
Réfregiration	2,85	3,39	3,29	3.08	3,29	2,64	2,97	2,91	2,92	2,93	1,96
cong.S cryo.	3,309	3,05	3,19		2,39	3.29	2,7	2,95	2,827	2,41	3,07
cong sacch.;	3,47	3,46	3,45	3,41	3,3	3,29	3,41	3,37	3,3	3,16	3,14
Cong; gly;	2,56	2,53	2,32	2,92	3,25	2,39	2,75	2,51	3,4	2,32	1,57
Cong: DMSO	3,25	3,24	3,23	2,93	2,22	1,87	3,42	3,17	3,15	3,26	2,8

Annexe 9 : Evolution de la souche de *Staphylococcus aureus* dans la viande cameline et du poulet (non contaminée et contaminée)traitée par les lactocoques ou les surnageants du culture durant l'entreposage à 4 ° C(Log UFC/g de produit)

	J0	**J0+1**	**J0+2**	**J0+6**
VR+SNCM	6,21853551	6,35998717	6,21383639	6,49767588
VR+SNCP	6,21853551	6,5713827	6,41796964	5,29305302
VR+SNB	6,21853551	7,372912	7,36172784	6,69897
VR +LcCM	6,21853551	6,40575604	5,56064776	5,27664559
VR+Lc CP	6,21853551	5,41796964	5,26951294	5,04921802
VR+LcB	6,21853551	6,91284886	6,88802215	5,81351427
VRC+SNCM	6,21853551	7,76342799	6,64522571	6,25527251
VRC+SNCP	6,21853551	7,5563025	5,67577834	
VRC+SNB	6,21853551	7,38021124	7,30963017	6,78207111
VRC+LcCM	6,21853551	6,64522571	6,76206306	6,56712051
VRC+LcCP	6,21853551	5,54057972	7,18184359	6,94448267
VRC+LcB	6,21853551	7,64542227	6,85402655	6,50267288
VB+SNCM	5,00389117	6,85957057	5,53837262	6,86493805
VB+SNCP	5,00389117	6,31386722	5,67959141	5,56497363
VB+SNB	5,00389117	7,31386722	6,30882043	6,7083359
VB +LcCM	5,00389117	7,75281643	5,51730149	6,12885142
VB+Lc CP	5,00389117	7,76342799	6,38021124	6,03774513
VB+LcB	5,00389117	7,77524626	6,23274206	5,48233038
VBC+SNCM	5,00389117	6,5713827	6,76342799	7,02530587
VBC+SNCP	5,00389117	6,23274206	6,03043779	6,7509864
VBC+SNB	5,00389117	7,34242268	6,76477372	6,56064776
VBC +LcCM	5,00389117	6,52680434	6,19412566	6,10469192
VBC+Lc CP	5,00389117	6,63437649	6,30492116	7,5797836
VBC+LcB	5,00389117	7,77232171	6,32031249	6,29305302