



MINISTRE 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 Doctorat en Sciences

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

THEME

**Contribution à l'étude des substances
antibactériennes produites par la flore lactique
isolée à partir du lait camelin (*Camelus
dromedarius*) de la région d'Ouargla**

Présenté par : Mme CHETHOUNA Fatma

Devant le jury :

Président	Mr. ADAMOUC A.	Pr.	(U.K.M.Ouargla)
Directrice de thèse	Mme. SIBOUKEUR O.	Pr.	(U.K.M.Ouargla)
Examineurs :	Mr. BABELHADJ B.	M.C.A	(E.N.S. Ouargla)
	Mme. BOUDJENAH - HAROUN S.	Pr.	(U.K.M. Ouargla)
	Mme. BECILA- HIOUAL S.	Pr.	(I.N.A.T.A.A Constantine)
	Mme. BOUGHELOUT H.	M.C.A	(I.N.A.T.A.A Constantine)

Année universitaire : 2020 – 2021

Dédicace

Je dédie cette thèse ...

✚ A mes chers parents

Maigres récompenses pour l'immense travail accompli. Que Dieu vous bénisse, vous protège et vous garde le plus longtemps avec nous.

✚ A mon mari et mes filles MAYAR et YARA

Pour l'amour qui nous unit. Ce travail est également le fruit de vos nombreux soutiens. Soyez en remerciés éternellement. Que Dieu les protègent pour moi

✚ A mes frères et sœurs

Sincères affections. Que Dieu vous accorde sa grâce et vous guide dans le droit chemin.

✚ A toute personne qui a prié pour moi avec sincérité.

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné le souffle, l'énergie et la volonté pour réaliser cette étude.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements à Madame SIBOUKEUR Oumelkheir, Professeur l'Université Kasdi Merbah Ouargla pour m'avoir guidée, en me proposant ce sujet. Sa grande rigueur scientifique, ses grandes qualités humaines, ses recommandations mesurées, son attention discrète m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Qu'elle trouve ici ma reconnaissance et mon respect pernes.

Je remercie très sincèrement tous les éminents chercheurs et scientifiques qui ont accepté de faire partie du jury de ma thèse :

- Monsieur ADAMOU Abdelkadder Professeur, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla,
- Madame BOUDJENAH-HAROUN Saliha, Professeur, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Madame BECILA-HIOUAL Samira, Professeur à l'I.N.A.T.A.A, Université de Constantine
- Madame BOUGHELOUT Halima, Maitre de Conférences A à l'I.N.A.T.A.A, Université de Constantine
- Monsieur BABELHADJ BAAISSA, Maitre de conférences A à l'école supérieure des enseignants d'Ouargla.

Je leur adresse ma profonde gratitude pour l'honneur qu'ils ont voulu me faire en acceptant de porter un jugement à cette thèse

- J e ne saurais oublier Mademoiselle BELDI Nadia, Maitre de Conférences B, Université Kasdi Merbah Ouargla, pour son aide (étude statistique) ;
- Monsieur le professeur MOUSSA-BOUDJEMAA Boumediene, Directeur du « Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement » « L.A.M.A.A.B.E », de l'Université de Tlemcen pour nous avoir fournis les souches pathogènes utilisée dans ce travail ;
- Monsieur BEGGARI EL-Aiche et tout le personnel de Laboratoires pédagogiques, trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour leur précieuse aide.

Mes remerciements s'adressent finalement à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail. Que toutes ces personnes soient assurées de ma reconnaissance.

Table des matières

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des photos
Liste des tableaux
Résumé

	Page
Introduction	01
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1 Généralités sur le dromadaire	04
1.2. Rôle et importance du dromadaire dans les régions arides et semi-arides	05
1.3. Production de lait	06
1.4. Caractéristiques du lait de chamelle	06
1.4.1 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques	06
1.4.2. Composition chimique et biochimique	07
1.4.2.1. Matière grasse	09
1.4.2.2. Matières protéiques	10
1.4.2.3. Vitamines	10
1.4.2.4 Sels minéraux	10
1.4.3. Utilisation médicinale et thérapeutique du lait de chamelle	11
1.4.3.1. Facteurs antimicrobiens	12
1.4.3.2. Facteurs anticancéreux	14
1.4.3.3. Facteur antidiabétique : l'insuline	14
1.4.3.4. Facteurs stimulants : la vitamine C	15
1.4.4. Qualité microbiologique du lait camelin	15
1.5. Microflore du lait	17
1.5.1. Flore saprophyte	17
1.5.1.1. Flore lactique	17
1.5.1.1.1. Classification des bactéries lactiques	20
1.5.1.1.2. Bactéries lactiques et fermentations alimentaires	28
1.5.1.1.3. Bactéries lactiques et santé humaine	29
1.5.1.1.4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	29
1.5.2. Flore contaminante	41
1.5.2.1. Flore d'altération	41

1.5.2.1.1. Flore thermorésistante	41
1.5.2.1.2. Les coliformes	41
1.5.2.1.3. Les psychrotrophes	42
1.5.2.1.4. Levures et moisissures	42
1.5.2.2 Bactéries pathogènes	43
1.5.2.2.1. Les staphylocoques	43
1.5.2.2.2. Les entérobactéries	44
1.5.2.2.3 Les Brucelles	44
1.5.2.2.4 Listeria	44
1.6. Traitement de préservation du lait : Pasteurisation du lait camelin	44
1.6.1. Pasteurisation basse	45
1.6.2. Pasteurisation rapide à haute température (High Temperatur Short Time ou HTST)	45
1.6.3. Pasteurisation haute	46
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
2.1 Matériel	47
2.1.1. Matériel biologique	47
2.1.2 Milieux de culture	47
2.1.3 Produits chimiques et réactifs	45
2.1.4. Appareillage	45
2.2 Méthodes d'analyse	49
2.2.1 Analyses physico-chimiques	50
2.2.1.1 Mesure du pH	50
2.2.1.2 Détermination de l'acidité Dornic	50
2.2.1.3. Détermination de l'extrait sec	51
2.2.1.4 Détermination de la densité	51
2.2.2. Analyses biochimiques	51
2.2.2.1 Dosage de la vitamine C	51
2.2.2.2 Dosage de la matière grasse	52
2.2.2.3 Dosage du lactose	52
2.2.2.4 Dosage des protéines	53
2.2.3 Analyses microbiologiques	54
2.2.3.1 Test de la réductase	54

2.2.3.2 Etude de la microflore de contamination (microflore exogène)	54
2.2.3.2.1 Recherche et dénombrement des germes halotolérants	55
2.2.3.2.2. Recherche et dénombrement des entérobactéries	55
2.2.3.2.3 Recherche et dénombrement des coliformes	56
2.2.3.3 Mise en évidence de l'effet autoépuratif du lait camelin durant l'entreposage	56
2.2.3.3.1 Evolution du pH et de l'acidité titrable durant l'entreposage	56
2.2.3.3.2. Evolution de la flore de contamination	56
2.2.3.4 Recherche des substances à activité antibactérienne	56
2.2.3.4.1 Isolement et culture des souches lactiques indigènes	57
2.2.3.4.2 Purification des souches	57
2.2.3.4.3 Conservation des isolats	58
2.2.3.4.4. Pré-Identification des bactéries lactiques isolées	59
2.2.3.4.5. Mise en évidence des inhibitions entre surnageant et souche cible	64
2.2.3.5. Optimisation des conditions de production des substances antibactérienne	66
2.2.3.5.1. Propagation des souches	66
2.2.3.5.2. Optimisation de la température	66
2.2.3.5.3. Optimisation du pH	66
2.2.3.6 Mise en évidence la nature de l'agent anti-bactérien	67
2.2.3.6.1. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène	68
2.2.3.6.2. Inhibition due aux acides organiques	69
2.2.3.6.3. Inhibition due aux phages	69
2.2.3.6.4. Inhibition due aux bactériocines	69
2.2.3.6. Suivi de la cinétique de croissance des souches test	70
2.2.3.6.1. Effet de substance antibactérienne sur la croissance de <i>staphylococcus</i>	71
2.2.3.6.2 Analyse statistique	71
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1 Caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et biochimiques du lait collecté du lait collecté	73
3.1.1 pH	73
3.1.2. Acidité titrable	74

3.1.3. Taux de matière sèche	74
3.1.4. Densité	74
3.1.5. Teneur en matière grasse	75
3.1.6. Teneur en lactose	75
3.1.7. Teneur en vitamine C	75
3.1.8 Teneur en protéines totales	76
3.1.9 Teneur en protéines sériques	76
3.1.10 Teneur en caséines	76
3.2. Caractérisation microbiologique du lait collecté	77
3.2.1 Qualité hygiénique du lait collecté	77
3.2.2. Dénombrement de trois principaux groupes bactériens de contamination du lait camelin	78
3.2.3 Mise en évidence de l'effet autoépuration du lait camelin, comparaison avec l'effet épuration de la pasteurisation	79
3.2.3.1 Evolution du pH et de l'acidité titrable du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée (entreposé à la température ambiante (25°C))	80
3.2.3.2 Evolution quantitative de la flore halotolérante du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée	81
3.2.3.3 Evolution quantitative des coliformes du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée	82
3.2.3.4 Evolution quantitative des entérobactéries du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée (25°C environ)	83
3.2.4 Isolement et culture des souches lactiques indigènes	85
3.2.4.1. Caractérisation macroscopique des souches indigènes isolées	85
3.2.4.2 Caractérisation microscopique des souches indigènes isolées	85
3.2.4.3. Caractérisation physiologique et biochimique des souches indigènes isolées	86
3.2.5. Recherche des substances à activité antibactérienne	96
3.2.5.1 Tests d'antagonisme	96
3.2.5.2. Optimisation des conditions de culture des souches productrices de substances antibactérienne	98
3.2.5.2.1. Propagation	98
3.2.5.2.2. Optimisation de la température d'incubation de la culture	99

3.2.5.2.3. Optimisation du pH du milieu de culture	101
3.2.6. Nature relative des substances inhibitrices produites par la flore lactique	102
3.2.6.1. Levée de l'inhibition due au peroxyde d'hydrogène	102
3.2.6.2. Levée de l'inhibition due aux acides organiques	103
3.2.6.3. Inhibition éventuelle due à une attaque phagique de la souche cible	105
3.2.6.4. Inhibition due aux bactériocines	105
3.2.6.4.1 Nature chimique des bactériocine	107
3.2.7 Cinétique de croissance des souches lactiques isolées	109
3.2.8. Effet des surnageants de cultures des souches tests sur la croissance de la souche cible	111
Conclusion	113
Références bibliographique	
Annexes	

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
BL	Bactéries Lactique
°C	Degré celsius
°D	Degré Dornic
Da	Dalton
ECHA	échantillon de lait cru
ECHB	échantillon de lait pasteurisé 63°C/20min
ECHC	échantillon de lait pasteurisé 72°C/15 sec
ECHD	échantillon de lait pasteurisé 85°C/2min
EDTA	l'acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
En	Enterococcus
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	GRAS (Generally Recognized As Safety)
HTST	High Temperatur Short Time
Lb	Lactobacillus
Lc	Lactococcus
Ln	Leuconostoc
SEn	Surnageant d'<i>enterococcus</i>
SLb	Surnageant de <i>lactobacillus</i>
SLc	Surnageant de <i>lactococcus</i>
SLn	Surnageant de <i>leuconostoc</i>
SNEn	Surnageant neutralisé d'<i>enterococcus</i>
SNLb	Surnageant neutralisé de <i>lactobacillus</i>
SNLc	Surnageant neutralisé de <i>lactococcus</i>
SNLn	Surnageant neutralisé de <i>leuconostoc</i>
ST	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Zi	diamètre de zone d'inhibition

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	voie fermentaire des bactéries lactiques (DESMAZEAUD et DE ROISSART, 1994)	19
2	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre des «<i>Lactobacillales</i>» au sein de la classe «<i>Bacilli</i> » (VOS <i>et al.</i>, 2009).	20
3	Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisin) et B (mersacidin) (DORTU et THONART, 2009)	33
4	Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (PAUL <i>et al.</i>, 2005)	36
5	Procédure expérimentale	49
6	Etapas suivies pour l'isolement des protéines totales, caséines et protéines sériques du lait de chamelle collecté.	53
7	Conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées	59
8	Schéma simplifié des étapes de la propagation de la souche	67
9	Mise en évidence de la nature de l'agent anti-bactérien	68
10	Schémas montre (A) Cinétique de croissance des souches lactiques isolées et (B) Effet de substance anti-microbiennne sur la croissance de <i>staphylococcus</i>	72
11	Evolution du pH et l'acidité titrable durant l'entreposage A et B à la température ambiante. C et D à température (4°C)	81
12	Evolution de la flore halotolérante durant l'entreposage du lait A : à température ambiante (25°C) B : à température (4°C)	82
13	Evolution des coliformes durant l'entreposage du lait A : à température ambiante (25°C) B : à température (4°C)	83
14	Evolution des entérobactéries durant l'entreposage du lait A : à température ambiante (25°C) B : à température (4°C)	84
15	Distribution des isolats lactiques en fonction des genres	86
16	Cinétique de croissance des souches lactiques isolées	110
17	Effet des substances antibactérienne sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	112

18	Effet des bactériocines sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	113
-----------	--	------------

Liste des photos

N°	Intitulé	Page
01	Morphologie de A: <i>Lactobacillus casei</i> and B: <i>Lactobacillus acidophilus</i> C : <i>Lactobacillus brevis</i>	23
02	Morphologie en microscopie électronique de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	25
03	Morphologie en microscopie électronique de <i>Leuconostocs lactis</i>	26
04	Aspect macroscopique des colonies isolées à partir du lait camelin A : sur milieu MRS B : sur milieu M17 C : sur milieu MSE	85
05	Production d'acétoïne	87
06	Production de CO ₂ à partir du citrate	88
07	Caractère hémolytique (hémolytique Y)	88
08	Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	89
09	Hydrolyse de l'esculine	90
10	Croissance des leuconostocs à 37°C	91
11	Activité antibactérienne à différentes températures vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100
12	Activité antibactérienne à différentes valeurs de pH vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	102
13	Activité antibactérienne vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	105
14	Zones d'inhibition créées par des surnageants des souches de leuconostoc et lactobacilles après traitement par des enzymes	106
15	Thermorésistance des Lb11 et Ln5, En22 à 121°C/15 min. en comparaison avec le témoin non traité	108
16	Traitement à différentes valeur de pH des surnageants de culture des souches de leuconostoc	109

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Constantes physiques du lait de dromadaire et de vache selon différents auteurs	07
II	Composition chimique globale (g/l) du lait de chamelle selon différents auteurs ; comparaison avec le lait de vache	08
III	Composition en vitamines (mg/l) du lait de chamelle selon différents auteurs ; comparaison avec le lait de vache.	09
IV	Composition en sels minéraux (mg/l) du lait de chamelle ((SIBOUKEUR, 2007) ; comparaison avec le lait de vache	11
V	Classification des groupes du genre <i>lactobacillus</i> (AXELLSSON , 1998)	22
VI	Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire, exemples d'espèces prédominantes d'après MCKAY et BALDWIN (1990)	28
VII	Liste des bactériocines appartenant à la classe III (KLAENHAMMER, 1993; RILEY et WERTZ, 2002)	35
VIII	Milieux nutritifs et conditions de culture de trois groupes de bactéries susceptibles de contaminer le lait camelin.	55
IX	Milieux d'isolement et conditions de culture des souches lactiques	57
X	Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des échantillons de lait camelin	73
XI	Test de la réductase	77
XII	Dénombrement des trois groupes bactériens de contamination du lait camelin cru et soumis à la pasteurisation	79
XIII	Critères de pré-identification des isolats lactiques (genres <i>Lactococcus</i>, <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> et <i>Leuconostoc</i>	92
XIV	Profils fermentaires des souches par galerie API 50 CH	94
XV	Micro-tests biochimiques de la souche En 22 et profil fermentaire (Galerie API 20 STREP)	95
XVI	Effet antibactérien vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 des 38 souches de bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de lait camelin collecté (méthode des puits)	97

XVII	Effet antibactérien vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 des souches de bactéries lactiques par la méthode de puits avant et après la propagation	99
XVIII	Activité antibactérienne à différentes températures, vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100
XIX	Activité antibactérien à différentes valeurs de pH vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	101
XX	Activité antibactérienne après la levée de l'effet de H₂O₂ et celles des acides organiques	104
XXI	spectre d'activité des substances antibactérienne (bactériocine) pour les six souches criblé (plus performante) après traitement thermique, Zone d'inhibition exprimée en mm	107
XXII	Spectre d'activité des substances antibactérienne (bactériocine) pour les six souches criblées (plus performante) à différentes valeurs de pH, Zone d'inhibition exprimée en mm	108

Résumé

Contribution à l'étude des substances antibactériennes produites par la flore lactique isolée à partir du lait camelin (*Camelus dromedarius*) de la région d'Ouargla

Le lait de chamelle renferme une teneur élevée en vitamine C et en niacine et un système protecteur efficace du à certaines protéines lactosériques, à des acides organiques et à des bactériocines produites par des bactéries lactiques.

Ce travail vise l'étude de la relation entre le comportement de flore (endogène et exogène) et l'autoépuration lors de la fermentation naturelle du lait issu de chameilles implantées dans la région Sud-Est du pays.

Sept échantillons collectés ont été analysés, les résultats de l'analyse physico-chimique et biochimiques obtenus, montrent que le lait de chamelle a généralement une composition comparable à celle du lait bovin.

Un suivi de l'évolution de trois groupes de bactéries susceptibles de contaminer le lait camelin du fait des conditions de traite non conformes et de sa salinité prononcée est réalisé. Le test de la réductase a révélé une qualité bonne à passable du lait cru collecté (temps de décoloration de l'ordre de 2h et demi). Les résultats montrent une tendance à une diminution progressive de la charge bactérienne contaminant dans les lots de lait cru entreposés à la température ambiante (25 °C environ) alors que dans les échantillons traités thermiquement (pasteurisation), cette flore de contamination est éliminée dès le début de l'expérience, Ainsi, le taux des coliformes passe de 9.13×10^2 ufc/ml à J_0 à $1,09 \times 10^2$ ufc/ml à J_{0+15} dans les échantillons entreposés à la température ambiante (25°C°). Celui des entérobactéries suit la même évolution mais de manière plus marquée puisqu'il passe de 5.02×10^2 ufc/ml à J_0 à 4.7×10 ufc /ml à J_{0+10} . Au-delà de cette durée, ils disparaissent complètement. Quant 'aux bactéries halotolérantes, le taux passe de 7.76×10^3 ufc/ml à J_0 à 2.74×10^3 ufc/ml à J_{0+15} . Parallèlement, des comportements similaires mais plus accentués sont relevés avec les lots réfrigérés.

L'analyse microbiologique de ces échantillons a détecté un nombre important de la microflore totale, Trente huit souches des bactéries lactiques appartenant au genre : Lactococcus (36.84%), Lactobacilus (34.21%), Enterococcus (15.78%), Leuconostoc (13.78%), ont été isolées sur milieu MRS, M17 et MSE à partir du lait cru de chamelle.

L'effet antibactérien à l'encontre d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été étudié, une action inhibitrice de la souche d'indication par ces souches lactiques isolées a été mise en évidence par des tests d'antagonisme, Les zones d'inhibition enregistrés sont compris entre 9 et 20mm, après élimination différentielle des substances responsables de l'activité inhibitrice

des *Staphylococcus*, le genre *Leuconostoc* (13.78%), a été retenu pour sa forte activité bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* après 24 h heures d'incubation.

L'étude de la cinétique de croissance de six souches (Lb11, Ln5, En22, Lc6, Lc 5et Lc3) isoler montre une croissance maximum après 18h et 24h pour Lb11 et En22 respectivement et après 21h pour Ln5, Lc3, Lc5, Lc6.

L'étude statistique pour comparer l'effet des substances antibactériennes (dans surnageant) sur la croissance de la souche pathogène montre que l'effet de surnageant non neutralisé des souches (Lb11, Ln5, En22, Lc6, Lc 5et Lc3) sur la souche cible est significativement non différent, Par contre l'effet de surnageant neutralisé (bactériocine) est significativement différent. La matrice de corrélation nous a permis de constaté que les substances antibactérienne produite par la souche *leuconostoc* exhibent une activité antibactérienne le plus prononcée envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Mots clés : bactéries lactiques, activité antibactérienne, *Staphylococcus aureus*, auto-épuration

Abstract

Contribution to the study of antibacterial substances produced by lactic flora from camel milk (*Camelus dromedarius*) in the region of Ouargla

Camel milk has a high content of vitamin C and niacin and an effective protective system due to certain whey proteins, organic acids and bacteriocins produced by lactic bacteria.

The aim of this work is to study the relationship between flora behavior (endogenous and exogenous) and self-purification during natural fermentation of milk from camels implanted in the country's Southeast area.

Seven samples were obtained and analyzed by physico-chemical, biochemical and microbiological methods. Results obtained of these tests shows that camel milk has a composition that is similar to that of bovine milk.

Seven samples collected were analyzed, the results of the physico-chemical and biochemical analysis obtained show that camel milk has a composition that is similar to that of bovine milk.

The evolution of three bacteria groups that are likely to contaminate camel milk as a result of non-compliant milking conditions and its pronounced salinity is monitored. The reductase test revealed a poor quality of the raw milk collected (time of discoloration of the order of 2.5 hours). Results shows that contaminating bacterial load in raw milk batches stored at ambient temperature (approximately 25 ° C) continues to decrease over time, while contamination flora is removed at the start of the experiment in heat treated samples (pasteurization). Thus, the coliform rate decreases from 9.13×10^2 CFU / ml at D0 to 1.09×10^2 CFU / ml on D0 + 15 in the samples stored at room temperature (25° C). The evolution of *Enterobacteria* is similar, but more pronounced, as it goes from 5.02×10^2 CFU / ml at D0 to 4.7×10^1 CFU / ml at D0 + 10. Beyond this duration, they disappear completely. For halotolerant bacteria, the rate goes from 7.76×10^3 CFU / ml to 2.74×10^3 CFU / ml on D0 + 15. At the same time, refrigerated batches display similar yet more pronounced behaviors. The microbiological analysis of these samples detected a significant number of the total microflora, Thirty-eight strains of lactic acid bacteria belonging to the genera: *Lactococcus* (36.84%), *Lactobacillus* (34.21%), *Enterococcus* (15.78%), and *Leuconostoc* (13.78%), were isolated on MRS, M17 and MSE medium from raw camel milk.

The antibacterial effect against a strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 has been studied. An inhibitory action of the indication strain by these isolated lactic strains was demonstrated by antagonism tests. Inhibitions recorded are between 9 and 20 mm. Following differential removal of the substances responsible for *Staphylococcus* inhibitory activity, the genus *Leuconostoc* (13.78%)

was chosen for its good bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* after 24 hours of incubation. The study of growth kinetics of six strains (Lb11, Ln5, En22, Lc6, Lc5 and Lc3) isolate shows maximum growth after 18h and 24h for Lb11 and En22 respectively and after 21h for Ln5, Lc3, Lc5, Lc6.

According to a statistical analysis comparing the effect of antibacterial substances (in supernatant) on the growth of the pathogenic strain, the effect of non-neutralized supernatant of the strains (Lb11, Ln5, En22, Lc6, Lc5 and Lc3) on the strain target is significantly non-different. On the other hand, the effect of neutralized supernatant (bacteriocin) is significantly different. Also, the antibacterial substances produced by the leuconostoc strain have the strongest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, according to the correlation matrix.

Keywords: lactic bacteria, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, self-purification

ملخص

مساهمة في دراسة المواد المضادة للبكتيريا التي تنتجها البكتيريا اللبنية المعزولة من حليب الناقة في منطقة ورقلة

يحتوي حليب الناقة على نسبة عالية من فيتامين س والنياسين ونظام وقائي فعال يتمثل في بروتينات مصّل اللبن والأحماض العضوية والبكتريوسينات التي تنتجها بكتيريا اللبني.

يهدف هذا العمل إلى دراسة العلاقة بين سلوك البكتيريا (الداخلية والخارجية) والتنقية الذاتية خلال التخمر الطبيعي لحليب الناقة في المنطقة الجنوبية الشرقية من البلاد.

تم تحليل سبع عينات التي تم جمعها. تظهر نتائج التحليل الفيزيائي والكيميائي والحيوي الذي تم الحصول عليه أن حليب الإبل له عمومًا تركيبة مماثلة لتلك الموجودة في حليب البقر.

مراقبة تطور ثلاث مجموعات من البكتيريا التي يحتمل أن تلوث حليب الإبل بسبب ظروف الحلب الغير السليمه وملوحتة. كشف اختبار الاختزال زمن تغير اللون (الذي يبلغ 2.5 ساعة) عن نوعية مقبولة من الحليب الخام الذي تم جمعه. وأظهرت النتائج مبدئياً إلى انخفاض تدريجي في البكتيريا الملوثة في مجموعات الحليب الخام المخزن في درجة الحرارة المحيطة (حوالي 25 درجة مئوية) بينما في العينات المعالجة حرارياً (البسترة)، يتم التخلص من البكتيريا الملوثة هذه في بداية التجربة بفعل الحرارة، حيث كمية القولونيات في اليوم الأول هو 9.13×10^2 بكتيريا في مليلتر من الحليب تصير 1.09×10^2 في العينات المخزنة في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية). يتبع تطور بكتيريا الأمعاء نفس التطور ولكن بكمية أكبر لأنه ينتقل من 5.02×10^2 بكتيريا في مليلتر من الحليب إلى 4.7×10 بكتيريا في مليلتر من الحليب في اليوم الحادي عشر من التخزين. وبعدها تنعدم تماماً.

. بالنسبة للبكتيريا التي تحتل الملوحة الكمية تنقص من 7.76×10^3 إلى 2.74×10^3 بكتيريا في مليلتر من الحليب في اليوم السادس عشر

اكتشف التحليل الميكروبيولوجي لهذه العينات عدداً كبيراً من البكتيريا، ثمانية وثلاثين سلالة من البكتيريا اللبنية المنتمية *Lactococcus* (36.84%) *Lactobacillus* (34.21%) *Enterococcus* (15.78%)، *Leuconostoc* 13.78% تم عزلها من حليب الإبل الخام

تمت دراسة تأثير المضاد البكتيري للسلالات البنية ضد السلالة المكورات الذهبية من خلال اختبارات التضييطة. تتراوح نسبة التضييطة بين 9 و 20 ملم، بعد القضاء التفاضلي على المواد المسؤولة عن النشاط التثبيطي للمكورات العنقودية، تم اختيار لوكونستوك لنشاطه القوي للجراثيم تجاه المكورات العنقودية الذهبية بعد 24 ساعات حضانة.

أظهرت الدراسة الإحصائية لمقارنة تأثير المواد المضادة للبكتيريا (في المادة الطافية) على نمو السلالة الممرضة أن تأثير المادة الطافية (البكتريوسين) غير متعادلة للسلالات اللبني على السلالة الممرضة. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

كلمات البحث: بكتيريا اللبني، نشاط مضادات للبكتيريا، المكورات العنقودية الذهبية، التنقية الذاتية

Introduction

Introduction

Les populations du Sud, les nomades en particulier, attestent depuis toujours que le lait de chamelle possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. Ils lui attribuent de multiples vertus médicinales.

De nombreux chercheurs continuent à s'investir sur ces aspects à double intérêt : nutritionnel et thérapeutique. Certains travaux ont pu démontrer l'existence d'une activité antimicrobienne du lait de chamelle permettant de protéger le chamelon et le consommateur. Les femelles de dromadaires produisent selon ces chercheurs un lait possédant des capacités à inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes GRAM⁺ et GRAM⁻, susceptibles de le contaminer en cas de manipulations non conformes aux règles de salubrité (SIBOUKEUR, 2018 ; SOUIDE *et al.*, 2015).

Le lait de chamelle est consommé localement à l'état frais ou fermenté. Durant sa fermentation, il a été constaté que le taux de bactéries lactiques (flore indigène) augmentait et que celui des bactéries de contamination diminuait. Il s'agirait d'une autoépuration naturelle qui existe également dans les laits des autres espèces laitières, mais dont la durée est limitée à quelques heures (6 h au maximum selon les conditions du milieu) qui suivent la traite.

Dans ce contexte, YAGIL *et al.*, (1994) soutenaient que la pasteurisation du lait de chamelle n'était pas indispensable si tous les dromadaires du troupeau sont en bonne santé.

Dans le même ordre d'idée, il a été rapporté que des propriétés antimicrobiennes et protectrices des protéines du lait de chamelle permettent d'avoir un produit sain durant plus de 24 heures, si les conditions d'hygiène (lavage et désinfection des ustensiles...etc.) et de température (inférieure à 15 °C) sont appliquées (FARAH, 1996 ; KAPPELER, 1998). Dans le cas contraire, le lait subit une détérioration. Celle-ci est toutefois plus prononcée dans le cas du lait de vache (BONFOH *et al.*, 2003). Cette particularité inhérente au lait camelin a été mise en évidence contre *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *rotavirus* (EL-SAYED *et al.*, 1992).

Un peu plus tard, SIBOUKEUR *et al.*, (2002) en isolant à partir du lait camelin des bactéries de contamination (halotolérantes, entérobactéries et coliformes), ont montré que leurs taux diminuaient durant les trois premiers jours de l'entreposage du lait à la température ambiante, alors que celui des bactéries lactiques avait tendance à augmenter : il s'agit d'un effet auto-épuratif puissant caractérisant ce lait.

Récemment, CHETHOUNA *et al.*, (2018) ont confirmé cet effet autoépuratif qui se manifeste lors de la fermentation spontanée de ce lait, par un suivi de l'évolution de la flore de contamination dans des échantillons du lait cru en comparaison avec l'effet de la pasteurisation.

Cette activité antibactérienne rapportée par de nombreux auteurs ((BARBOUR *et al.*, 1984 ; EL-SAYED *et al.*, 1992 ; SIBOUKEUR, 2002 ; CHETHOUNA *et al.*, 2018) serait due à la présence des protéines lactosériques (Lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine...), plus efficaces que dans le cas des laits des autres espèces laitières (EL-SAYED *et al.*, (1992).

Parallèlement, on reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antagonistes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des protéines antimicrobiennes (KLAENHAMMER *et al.*, 1994) empêchant la propagation et la dominance de la flore indésirable. Dans cette panoplie de défense antibactérienne, qu'elle est la part de chacune des substances produites par la flore endogène dans ce système autoépuratif auquel le lait camelin doit une grande partie de sa célébrité ?

La présente étude s'inscrit dans ce contexte et vise à répondre à cette question en établissant la relation entre le comportement de flore (indigène et exogène) et l'autoépuration, lors de la fermentation spontanée, unique forme de conservation des excédents du lait de chamelles.

Elle comporte les sept volets d'investigations complémentaires ci-après, permettant de mieux cerner cet écosystème :

1/ caractérisation physico-chimique, biochimique et microbiologique du lait cru de chamelle collecté dans différentes régions du Sud-Est algérien; OUARGLA, TOUGGOURT, TAIBET, GHARDAIA

2/ Evolution de la flore de contamination lors de la fermentation spontanée du lait cru entreposé à la température ambiante en comparaison avec celle du lait pasteurisé entreposé dans les mêmes conditions ;

3/ Isolement et identification de quelques souches bactériennes lactiques susceptibles de produire des substances antibactériennes (peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines) et leur conservation ;

4/ Optimisation des conditions de culture ;

5/ Tests d'antagonismes de ces souches vis-à-vis d'une souche cible (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ;

6/Evaluation de l'effet de chacune des substances antibactériennes sur la souche cible, par leur élimination différentielle et recherche la ou les souches les plus performantes.

7/ Etude de leur cinétique de croissance et de l'effet des surnageant de leur culture sur la souche pathogène cible

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1.1 Généralités sur le dromadaire

Le nom « dromadaire » dérive du terme grecque « dromados » qui veut dire course. Il est donné à l'espèce de chameau à une seule bosse.

Les dromadaires appartiennent à la famille des camélidés, qui sont des mammifères artiodactyles d'origine nord-américaine, mais ils ont disparu de ce continent alors qu'ils se répandaient en Amérique du Sud, en Asie, puis en Afrique, continents où ils ont survécu pour donner naissance aux espèces de nouveau monde.

La famille des camélidés comprend, actuellement, 3 genres et 7 espèces :

➤ genre *Camelus*

- *Camelus dromedarius* (dromadaire)
- *Camelus bactrianus* (chameau de Bactriane)
- *Camelus ferus* (chameau sauvage de Tartarie) qui depuis peu, est reconnu comme une

espèce sensiblement différente de l'espèce domestique du Bactriane.

➤ genre *Lama*

- *Lama glama* (lama)
- *Lama guanicoe* (guanaco)
- *Lama pacos* (alpaga ou alpaca)

➤ genre *Vicugna*

- *Vicugna vicugna* (vigogne).

Selon les statistiques de la FAO(2019), la population cameline mondiale s'élève à environ 34 millions de têtes en 2017 dont plus de 30 millions sont recensées en Afrique et 4 millions en Asie. La grande majorité de cette population (84%) sont des dromadaires (*Camelus dromedarius*) qui vivent dans les régions arides du Nord et du Nord-Est de l'Afrique. Le reste soit 16%, sont des « bactriens » (*Camelus bactrianus*) qui sont des chameaux à deux bosses peuplant les régions froides de l'Asie.

L'Algérie, avec ses 2.381.741km² de superficie totale (premier plus grand pays d'Afrique après la division du Soudan), partageant sa frontière occidentale avec le Maroc et le Sahara-Occidental, sa frontière méridionale avec le Niger, le Mali, la Mauritanie et sa frontière orientale avec la Libye et la Tunisie. Ses 1.200km de littoral septentrional courent le long de la Mer Méditerranée. Peuplée 43 millions d'habitants en 2019, sa population est répartie dans 48 wilayat. Le dromadaire est présent dans 17 Wilaya avec 381 882 têtes en 2017 (F.A.O, 2018).

94,24 % du cheptel dans les neuf wilayas sahariennes : Ouargla, Ghardaïa, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf, Béchar et Biskra et 5,76 % du cheptel dans huit wilayas steppiques : Laghouat, Tbessa, Tiaret, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, et M'sila (M.A.D.A.R., 2015).

L'Algérie est classée parmi les pays dont l'effectif camelin connaît une croissance élevée, récente classant de ce fait l'Algérie au 14ème rang mondial (FAO, 2018).

1.2. Rôle et importance du dromadaire dans les régions arides et semi-arides

Dans ces régions, le dromadaire est utilisé à des fins multiples. Il est exploité principalement pour le transport des marchandises, des personnes et pour la fourniture de cuir, de viande et de lait. La viande (et abats) et le lait représentent une source de protéines régulière, très prisée, pour la population du Sud, les autochtones en particulier.

Ce rôle multiple de cette espèce animale découle de sa remarquable adaptation aux conditions de milieux très difficiles qui pourtant lui permettent de prospérer là où aucun autre animal domestique ne peut même pas survivre.

Cette exceptionnelle résistance résulte de plusieurs particularités anatomiques et physiologiques de cet animal. Lorsqu'il dispose de fourrages verts, il peut rester en saison tempérée plusieurs mois sans s'abreuver. En période très chaude, il peut rester sans boire pendant 8 à 10 jours et perdre jusqu'à 30 % de sa masse corporelle par déshydratation (YAGIL et ETZION, 1980; YAGIL, 1982; WILSON, 1984; YAGIL, 1985; RAMET, 1987).

La morphologie de l'animal caractérisée par la longueur des membres et du cou et par la forme cylindro-conique de l'abdomen, crée une grande surface favorable aux échanges thermiques. La conductivité thermique générale du corps est favorisée par la localisation des réserves adipeuses au niveau de la bosse (WILSON, 1984 ; YAGIL, 1986).

Une seconde contrainte imposée par les milieux arides et semi-arides, est la rareté et la médiocre qualité alimentaire de la flore végétale des parcours. Dans ce contexte, le dromadaire se distingue des autres ruminants par la variété de son régime alimentaire. Il peut indifféremment se nourrir de plantes herbacées, d'arbustes, de pousses d'arbres et même de cactées et de noyaux de dattes. Pendant la saison sèche, il ne dispose le plus souvent que de plantes desséchées ou épineuses, pauvres en protéines mais très riches en fibres et en cellulose (PEYER DE FRABREGUES, 1989 ; CHEHMA, 2005 ; TRABELSI, 2016).

1.3. Production de lait

Sur la base d'une population de femelles en lactation de l'ordre de 20 % des effectifs de dromadaires et d'une production laitière moyenne disponible (hors prélèvement par le chamelon) de 1 500 litres par an et par animal, la production totale de la région (Afrique du nord) pourrait être estimée à 263 700 tonnes, soit plus de 10 fois les chiffres répertoriés par le site des statistiques de la (FAO., 2011) dont 23 500 tonnes de lait (FAYE *et al.*, 2014). Les quantités de lait de chamelle produites en Egypte sont indéterminées, même que celles de la partie saharienne du Maroc. Pourtant, dans ces pays, la production et la commercialisation du lait de chamelle est loin d'être nulle (FAYE *et al.*, 2014).

Les productions individuelles varient entre 1000 et 2700 litres par an en Afrique, mais peuvent atteindre 7 000 à 12 000 litres selon certaines sources, en Asie du Sud.

La courbe de lactation est comparable à celle des bovins avec une persistance meilleure. La durée de la lactation est très variable (de 8 à 18 mois en général), soit des durées plus importantes en moyenne par rapport aux vaches laitières dans les mêmes conditions (FAYE, 2004).

La productivité laitière des chameaux (250 kg/Unité Bétail Tropical/an) est supérieure à celle des petits ruminants (220 kg) et à celle des zébus (100 kg) (FAYE, 2003).

1.4. Caractéristiques du lait de chamelle

1.4.1 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques

Le lait de chamelle est de couleur blanc-mate, d'un goût plus ou moins salé et d'un aspect plus visqueux que le lait de vache, qui est de couleur jaunâtre. Ces caractéristiques et surtout le goût, diffèrent selon l'alimentation des animaux et la disponibilité en eau.

L'ingestion de fourrages comme la luzerne, donne un goût sucré, certaines plantes halophytes le rendent salé (FARAH et BACHMAN, 1987 ; SBOUI *et al.*, 2009).

Le pH du lait camelin se situe autour de 6,40 - 6,55 et l'acidité titrable est de l'ordre de 15 - 18°D. Sa densité oscille entre 1,02 et 1,030 (KAMOUN, 1995 ; SBOUI *et al.*, 2009 ; CHETHOUNA, 2011 ; BOUDJENAH, 2012 ; DJAMAN, 2018) (tableau I).

Tableau I : Constantes physiques du lait de dromadaire et de vache selon différents auteurs

Paramètres	Lait de chamelle	Lait de vache	Références
pH	6,51	6.65	KAMOUN,1995
	6.52-6.55	6.66	BOUDJENAH,2012
	6.40-6.42	6.55	DJAMAN,2018
	6.41	6.56	SBOUI <i>et al.</i> , 2009
Acidité titrable (°D)	15.6	16	KAMOUN,1995
	17.5-17.7	16	BOUDJENAH,2012
	18.13-18.52	17.18	DJAMAN, 2018
	17.2	17.12	SBOUI <i>et al.</i> ,2009
Densité	1.028	1.032	KAMOUN,1995
	1.028-1.029	1.034	BOUDJENAH,2012
	1.028-1.030	1.030	DJAMAN,2018
	1.02	1.028	SBOUI <i>et al.</i> ,2009

1.4.2. Composition chimique et biochimique

La composition chimique globale du lait de chamelle (Tableau II), même si elle fluctue selon les auteurs (donc selon les animaux et l'environnement considéré), montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache. Les teneurs en protéines et en matière grasse varient respectivement de 28 - 33,77 g/l et de 28 - 42,87 g/l, alors que la teneur en lactose fluctue entre 35,23 et 43,87 g/l (tableau II).

Tableau II : Composition chimique globale (g/l) du lait de chamelle selon différents auteurs ; comparaison avec le lait de vache.

Origine du lait	Constituants				Références
	MST	Lactose	MG	Protéines	
Lait de Chamelle	134	55	36	33	BAYOUMI 1990
	109	41	31	28	ELAMIN et WILCOX, 1992
	87	45	11	32	MEHAIA, 1992
	126	45	34	33	KAMOUN, 1994
	131	49	46	30	LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, 1994
	113.5	-	32.2	29.1	MEHAIA <i>et al.</i> , 1995
	128	-	32.2	31.5	ATTIA, 2000
	113.11	43.87	28	35.68	SIBOUKEUR 2007
	119.438	42.78	37.5	34.15	SBOUI <i>et al.</i> , 2009
	102.42	40.8	29.33	28.25	CHETHOUNA, 2011
	113.11	-	28	35.68	SIBOUKEUR, 2012
	109.2	35.23	30	34.15	BOUDJENAH, 2012
	100.77-141.5	-	25 - 42.87	15.53-29.20	ARROUM <i>et al.</i> , 2015
	118.29 - 125.34	39.39 - 40.27	30.69 - 32.65	31.54 - 33.77	DJAMAN, 2018
Lait de Vache	128	48	37	34	FAO, 1992

N.B : MST = matière sèche totale – MG = matière grasse.

La teneur en eau du lait camelin, qui varie selon son apport dans l'alimentation, atteint son maximum pendant la période de sécheresse. En effet, il a été montré que la restriction en eau alimentaire des chameaux se traduit par une dilution du lait : un régime riche en eau donne un lait ayant un taux de 86% alors que dans un régime déficient, celui-ci s'élève à 91% (YAGIL et ETZION, 1980 ; FAYE et MULATO, 1991). Cette dilution pourrait être l'effet d'un mécanisme d'adaptation naturelle pourvoyant en eau les chameaux durant la période de sécheresse.

La composition en vitamines du lait de dromadaire (tableau III) diffère de celle du lait de vache par une teneur plus élevée en vitamine C. Le taux de vitamine A varie de 0,15 g/l de lait (SAWAYA *et al.*, 1984) à 18,6 g/l (SBOUI *et al.*, 2016) . Il en est de même pour

la teneur en riboflavine et en vitamine E (Tocophérol).

Tableau III : Composition en vitamines (mg/l) du lait de chamelle selon différents auteurs ; comparaison avec le lait de vache.

Vitamines	Lait de chamelle				Lait de vache
	SAWA YA <i>et al</i> (1984)	KAPPELER (1998)	FARA H <i>et al</i> (1992)	SBOUI <i>et al.</i> ,2016	SBOUI <i>et al.</i> ,2016
A (Rétinol)	0,15	0,15	0,1	18,6	7,26
B1 (Thiamine)	0,33	0,6	-	1,54	1,84
B2 (Riboflavine)	0,42	0,8	0,57	7,85	11,34
B3 (Niacine)	4,6	4,6	-	391,2	165,6
B5 (Acide pantothénique)	0,880	0,88	-	-	-
B6 (Pyridoxine)	0,523	0,52	-	1,19	6,76
B12 (Cobalamine)	0,002	0,002	-	-	-
B9 (Acide folique)	0,004	0,004	-	0,69	15,52
E (Tocophérol)	-	0,53	0,56	27,6	33,48
C (Acide ascorbique)	24	24 -36	37	169,73	25,64

1.4.2.1. Matière grasse

Le lait de chamelle renferme moins de matière grasse que le lait de vache. Cependant, les globules gras du lait de chamelle sont relativement de très petites tailles (1,2 à 4,2 μ de diamètre) et restent donc en suspension même après 24 heures de repos, contrairement au lait de vache dans lequel ces globules constituent une couche grasse qui remonte à la surface au bout de quelques heures.

Par ailleurs, la matière grasse du lait de chamelle apparaît liée aux protéines, tout ceci explique la difficulté à baratter le lait de chamelle pour en extraire le beurre. Comparée au lait de vache, la matière grasse du lait de chamelle contient moins d'acides gras à courtes chaînes (SIBOUKEUR,2007). Cependant sa teneur en acide gras volatils et en acides gras insaturés est importante.

1.4.2.2. Matières protéiques

Le taux de caséine totale est un peu plus faible dans le lait de dromadaire que dans le lait de vache; il représente 75 à 79 pour cent de la matière protéique contre 77 à 82 pour cent pour le lait de vache (MEHAIA, 1987). De plus l'équilibre entre les différentes fractions caséiniques est très différent et se caractérise par une proportion limitée à 5 pour cent de caséine Kappa alors qu'elle est de 13,6 pour cent dans le lait de vache (JARDALI, 1988; JARDALI et RAMET, 1991). La composition en acides aminés de ces fractions caséiniques n'est pas non plus la même que pour le lait de vache (SAWAYA, 1984; LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, 1989; FARAH et RUEGG, 1989; MOHAMED, 1990). Une autre particularité de la caséine du lait de dromadaire est qu'elle est distribuée sous forme de micelles ayant un diamètre double de celui du lait de vache (FARAH ET BACHMANN, 1987; JARDALI, 1988; FARAH et RUEGG, 1989; JARDALI et RAMET, 1991). La composition des protéines solubles du lait de dromadaire est également différente de celle du lait de vache; leur quantité est supérieure (0,9 à 1 pour cent contre 0,7–0,8 pour cent). Deux types d' α -lactalbumine (CONTI *et al.*, 1985) et une protéine originale (BEG *et al.*, 1987) y ont été décelés; de plus la présence de β -lactoglobuline est controversée.

1.4.2.3. Vitamines

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamines B3 (niacine) et en vitamine C (Tableau III). Des variations importantes (de 25 à 60 mg/l) de la teneur de cette dernière dans le lait camelin ont été rapportées par certains auteurs (FARAH, 1993). Plus récemment, une teneur de 169,73 mg/l a été signalée par SBOUI *et al.*, (2016). Globalement, les valeurs citées dans la littérature, sont en moyenne plus élevées que celles relatives au lait bovin, qui ne dépassent pas 22 mg/l selon MATHIEU (1998). Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité (SIBOUKEUR, 2007).

1.4.2.4 Sels minéraux

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle (Tableau IV) sont aussi diversifiés que ceux rencontrés dans le lait de vache. On y dénombre en effet des macro et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, magnésium, calcium, fer, cuivre, zinc...etc.).

Au niveau quantitatif, si la composition en macro-éléments (Na, K, Ca, Mg...) est relativement similaire à celle du lait bovin, le lait camelin se caractérise néanmoins par des

taux plus élevés en oligo-éléments (YAGIL et ETZION, 1980 ; SAWAYA *et al*, 1984 ; ELAMIN et WILCOX, 1992; BENGOUIMI *et al*, 1994 ; MEHAIA *et al*, 1995 ; GORBAN et IZZELDIN, 1997).

Tableau IV : Composition en sels minéraux (mg/l) du lait de chamelle ((SIBOUKEUR, 2007) ; comparaison avec le lait de vache.

Origine du lait	Ca	Mg	P	Na	K	Fe	Zn	Cu	Mn	I	Pb	Références
Lait de Chamelle	1060	120	630	690	1560	2,6	4,4	1,6	0,2	--	--	YAGIL et ETZION, (1980)
	1078	122	641	702	1586	2,64	4,47	1,63	0,20	--	--	SAWAYA <i>et al</i> , (1984)
	1310	140	510	270	450	0,4	0,1	0,02	--	--	--	GNAN et SHEREHA, (1986)
	1160	80	710	360	620	--	--	--	--	--	--	HASSAN <i>et al</i> , (1987)
	300	45	--	431	725	2,8	--	--	--	--	1,8	ELAMIN et WILCOX, (1992)
	1462	108	784	902	2110	3,4	2,9	0,1	2,0	0,1	--	BENGOUIMI <i>et al</i> , (1994)
	1180	125	889	688	1464	2,34	6,00	1,42	0,80	--	--	MEHAIA <i>et al</i> , (1995)
	1182	74	769	581	1704	1,3	5	--	0,1	--	--	GORBAN et IZZELDIN, (1997)
	1230	90	1020	660	1720	--	--	--	--	--	--	ATTIA <i>et al</i> , (2000)
Lait de Vache	°100- 1500	°100- 150	°750- 1200	°350- 1000	°1200- 1800	*0,20- 0,50	*2,00- 5,00	*0,02- 0,15	*0,03- 0,05	*0,01- 0,05	*0,04- 0,08	(°) et (*)

N.B : (--) : non déterminé ; (°) : selon MIETTON *et al*, 1994. ; (*) : selon LUQUET, 1985

1.4.3. Utilisation du lait de chamelle dans la thérapeutique traditionnelle

Le lait de chamelle est apprécié traditionnellement pour ses propriétés prétendues anti-infectieuse, anti-cancéreuse, anti-diabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents. Ces présomptions relèvent cependant le plus souvent d'observations empiriques dont les fondements scientifiques continuent à susciter la curiosité de nombreux chercheurs de par le monde. Toutefois, bien qu'empiriques, ces

constatations peuvent être reliées à la composition de ce bioproduit. Ainsi, certains composants pourraient, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, être associés à ces propriétés particulièrement les facteurs anti- microbiens. A cela s'ajoutent les propriétés probiotiques des bactéries lactiques présentes dans le lait camelin fermenté, seule forme de conservation connue en Algérie, jusque là.

1.4.3.1 .Facteurs antimicrobiens

Parmi les facteurs antimicrobiens, on retiendra essentiellement, la lactoferrine, le lysozyme, la lactoperoxydase et les immunoglobulines.

❖ Lactoferrine

La lactoferrine (LF) est une glycoprotéine contenant deux sites capables chacun de fixer un ion ferrique (Fe^{3+}). Cette capacité à capter le fer, explique en partie son rôle dans le contrôle de la croissance de certaines bactéries pathogènes, telles que *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* (ZAGULKI *et al.*, 1989 ; DIARRA *et al.*, 2002). Sur le plan des propriétés physiques, la lactoferrine du lait de dromadaire, comme beaucoup d'autres protéines lactières camelines, est plus thermorésistante que chez les autres espèces et plus thermorésistante que l'immunoglobuline (IgG). Par exemple, à 85 °C pendant 10 minutes, la lactoferrine du lait de chamelle représente 37% de la valeur initiale, contre 1,2 % pour le lait de vache et 0% pour le lait de bufflesse, dans les mêmes conditions (ELAGAMY, 2000). La LF n'est pas une protéine spécifique du lait. On la trouve dans la plupart des sécrétions des mammifères (larmes, salive, sécrétions utérines, sang, sécrétions nasales, urines, fluide amniotique, plasma séminal). Elle est cependant particulièrement abondante dans le lait de chamelle puisqu'on en trouve de 30 à 100 fois plus que dans le lait de vache (KANUSPAYEVA *et al.*, 2003).

❖ Lysozyme

Le lysozyme est une protéine naturellement présente dans les laits de mammifères où il représente un facteur antimicrobien puissant. Le lysozyme contient une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés, avec un poids moléculaire d'environ 14kDa. Dans le milieu physiologique, le lysozyme est chargé positivement, son pHi étant compris entre 10,5 et 11, il se lie en conséquence, électrostatiquement sur les surfaces anioniques des bactéries. Les bactéries à GRAM négatif sont plus résistantes au lysozyme car elles contiennent une membrane externe de lipopolysaccharides, qui les protège contre l'accès de cette molécule. En revanche, les bactéries, telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces*

viscosus, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *bronchiseptica*, *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Helicobacter pylori*, les levures, telles que *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, et le virus *Herpès simplex* sont sensibles au lysozyme (KONUSPAYEVA *et al.*, 2003).

La quantité de lysozyme contenue dans le lait de chamelle est plus élevée que dans le lait de vache, 15 $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$ contre 7 $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$. L'activité enzymatique du lysozyme du lait de chamelle est également plus forte que celle de la vache, mais plus faible que celle de l'oeuf (ELAGAMY *et al.*, 1996). Tout comme la lactoferrine de cette espèce, le lysozyme du lait de chamelle est thermorésistant. A 85 °C pendant 10 minutes, le lysozyme du lait de chamelle ne représente plus que 44 pour cent de la valeur initiale, contre 26 pour cent pour le lait de vache et 18 pour cent pour le lait de bufflesse dans les mêmes conditions (ELAGAMY, 2000).

❖ Immunoglobulines

Les IgG jouent un rôle dans le système immunitaire chez les nouveau-nés. Le taux des immunoglobulines est très élevé dans le colostrum de tous les mammifères. Cependant, la concentration d'immunoglobulines dans le lait varie selon les espèces concernées. Du point de vue structural, les IgG du dromadaire sont plus proches des immunoglobulines humaines que de celles des autres ruminants. Le pic d'IgG dans le colostrum est de $0,26 \pm 0,232 \text{ mg/ml}$. Il se situe entre 18 et 30 heures après la naissance (HULSEBUS, 1999). Dans le lait, la concentration est plus faible mais la teneur répertoriée dans le lait de chamelle est quatre fois supérieure à celle de la vache à 0 °C, et six fois plus élevée à 65 °C (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004). Par ailleurs, elle est plus thermorésistante : il reste 0,048 mg/ml d'IgG dans le lait de chamelle à 85 °C alors qu'elle disparaît dans le lait de vache (ELAGAMY, 2000).

❖ Lactoperoxydase

Les peroxydases sont des enzymes qui appartiennent aux systèmes non-immuns normaux de la défense du lait. On les trouve également dans les sécrétions des glandes à sécrétion externe (tels que la salive, les larmes, les sécrétions intestinales, le mucus cervical et la thyroïde).

Le lait contient naturellement assez de lactoperoxydase pour que le système soit actif. L'action du système peroxydase résulte de l'oxydation de l'ion SCN⁻ en présence du peroxyde d'hydrogène, qui fait apparaître des oxacides ayant des propriétés bactéricides. Le premier produit de l'oxydation est l'ion hypothiocyanate (OSCN⁻), puis différents acides se succèdent, dont l'action inhibitrice varie en fonction des espèces microbiennes.

L'action de la lactoperoxydase est susceptible d'être renforcée artificiellement en optimisant les concentrations des éléments qui entrent en jeu (soufre et du H₂O₂) (KONUSPAYEVA *et al.*, 2003). Des bactéries, telles que *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Capnocytophaga ochracea*, *Selenomonas sputigena*, *Wolinella recta*, *Enterobacter cloaca*, des virus, tels que *Herpès simplex*, *virus d'immuno-déficiência*, *virus respiratoire syncytial*, et la levure *Candida albicans*, sont sensibles au système lactoperoxydase. Cette enzyme du lait de chamelle est considérée comme étant une des plus thermorésistantes par rapport au lait de vache. La lactoperoxydase du lait de chamelle a 78 kDa de masse moléculaire (ELAGAMY *et al.*, 1996).

Par ailleurs, la lactoperoxydase du lait de chamelle présente une stabilité encore plus forte vis-à-vis des traitements thermiques. Elle est, par exemple, fortement active dans les échantillons de lait pasteurisé de la laitière de Mauritanie (SABUMUKAMA, 1997). Les résultats du test API ZYM lactoperoxydase sur le lait de dromadaire montre encore une activité enzymatique à forte température, alors même que la lactoperoxydase du lait de vache a perdu toute activité (LOISEAU *et al.*, 2001).

1.4.3.2. Facteurs anticancéreux

La lactoferrine jouerait un rôle reconnu dans le traitement de certains cancers et ses effets anti-tumoraux ont été étudiés notamment chez le rat (JOUAN, 2002). Partant de ces résultats observés en laboratoire, CHISSOV *et al.*, (1995) ont élaboré une préparation à base de lactoferrine à utiliser dans les zones oropharyngiennes après une chimiothérapie.

La LF est capable de participer aux processus de prolifération et de différenciations cellulaires. Elle a également été identifiée en tant que « Colony Inhibitory », agissant au niveau des cellules de la moelle épinière durant la myélopoïèse (LINDEN, 1994). Les cellules traitées à la lactoferrine montrent un arrêt définitif de toutes les fonctions, incluant l'arrêt de

l'activité métabolique des précurseurs de l'ADN et de l'ARN.

1.4.3.3. Facteur antidiabétique

L'amélioration du statut glycémique chez les diabétiques traités au lait de chamelle serait due à la présence d'insuline en quantité importante (52 UI/l): plus 5000 fois la valeur observée chez la vache et 1000 fois la valeur observée chez la femme. L'insuline est normalement neutralisée lors du caillage du lait dans l'estomac sous l'effet de l'acidité du milieu, mais il semble que le lait de chamelle ne caillant pas comme ceux des autres espèces, l'insuline pourrait être conservée intacte dans l'intestin où elle pourrait être absorbée (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004).

SBOUI *et al.*, 2016 indiquent que l'activité antidiabétique du lait camelin sur des chiens alloxanisés a montré une régulation de la glycémie moyenne après cinq semaines de traitement avec le lait cru de dromadaires (de 10,88 mmole/l avant le traitement jusqu'à 5,77 mmole/l à la fin de l'expérimentation).

En tout état de cause, il semble que la consommation régulière de lait de chamelle ait une action hypoglycémisante et régulatrice de la glycémie chez les patients insulinodépendants (AGRAWAL *et al.* 2003).

1.4.3.4. Facteurs stimulants : la vitamine C

Le taux de vitamine C dans le lait de chamelle est 3 fois plus élevé que dans le lait de vache ($37,4 \pm 11,0$ mg/l). Il varie entre 26,2 et 61,1 mg/l (FARAH *et al.*, 1992 ; HADADDIN *et al.*, 2008 ; CHETHOUNA, 2011; BOUDJENAH, 2012 ; SBOUI *et al.*, 2016 ; DJAMAN, 2018). La réputation du lait camelin est en grande partie due à sa richesse en vitamine C (SIBOUKEUR, 2007 ; SEBOUI *et al.*, 2016). De tous les laits de mammifères collectés pour les besoins de l'Homme, celui de la chamelle est le plus riche en cette vitamine dont le rôle tonique permettant de lutter contre la fatigue et l'infection est bien connu. La vitamine C joue un rôle biologique considérable par ses propriétés anti-oxydantes, Il a été montré qu'elle avait aussi une action positive sur la réponse immunitaire des organismes agressés par diverses maladies (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004 ; SCHWARTZ, 2016 .).

1.4.4. Qualité microbiologique du lait camelin

A la sortie de la mamelle, le lait de toutes les espèces, est à la température de l'animal (37 °C) (LARPENT, 1997 ; GUIRAUD, 1998 ; CAROLE 2002). Malgré cette condition, favorable à la multiplication de nombreux germes, celle-ci est inexistante pendant les quelques heures qui suivent la traite, en raison du pouvoir bactériostatique du lait frais (FAO, 1992). Cependant, le refroidissement du lait permet de ralentir la prolifération des micro-

organismes quand la phase bactériostatique s'arrête (FAO, 1992).

Concernant le lait de dromadaires, il a été rapporté que des propriétés antimicrobiennes et protectrices des protéines du lait de chamelle permettent d'avoir un produit frais à plus de 24 heures, si les conditions d'hygiène (lavage et désinfection des ustensiles) et de température (inférieure à 15 °C) sont appliquées (FARAH, 1996 ; KAPPELER, 1998). Dans le cas contraire, le lait subit une détérioration qui reste quand même plus prononcée dans le cas du lait de vache (BONFOH *et al.*, 2003).

- YAGIL *et al.*, (1994) soutenaient quant' à eux, que la pasteurisation du lait de chamelle n'était pas indispensable si tous les dromadaires du troupeau sont en bonne santé.,
- MALE *et al.*, (2003) jugent la pasteurisation indispensable pour réduire une charge microbienne élevée due aux mauvaises conditions d'hygiène lors de la traite ou à l'exposition du lait aux fortes températures qui règnent dans les zones arides et semi-arides et qui sont favorables à la croissance des micro-organismes. Celle des bactéries pathogènes en l'occurrence.
- AL-MOHIZEA *et al.*, (1994), en s'appuyant sur la numération de quatre groupes de micro-organismes (la flore aérobie totale, les psychrotrophes, les coliformes et bactéries sporulantes) déduisent que la qualité hygiénique du lait camelin est satisfaisante.

Dans ce contexte, une inhibition des bactéries pathogènes par le lait camelin a été observée par certains auteurs (BARBOUR *et al.*, 1984 ; SIBOUKEUR *et al.*, 2002 ; CHETHOUNA *et al.*, 2018).

- SIBOUKEUR *et al.*, (2002) en isolant à partir du lait camelin des bactéries halotolérantes, des entérobactéries et des coliformes ont montré que leurs taux diminuaient durant les trois premiers jours de l'entreposage du lait à la température ambiante, alors que celui des bactéries lactiques avait tendance à augmenter : il s'agit d'un effet autoépuratif puissant
- SIBOUKEUR (2007) a confirmé la présence de cet effet auto-épuratif particulièrement efficace et que le PP3 isolé par FPLC, possédait une action inhibitrice fortement prononcée contre les bactéries halotolérantes et assez peu prononcée contre les entérobactéries.
- CHETHOUNA *et al.*, 2018, en comparaison avec l'effet de la pasteurisation. ont mis en évidence l'effet autoépuratif du lait camelin lors de sa transformation en lait

fermenté, par le suivi de l'évolution de la flore de contamination dans des échantillons de lait cru.

Cette activité anti-microbienne du lait de chamelle rapportée par de nombreux auteurs ((BARBOUR *et al.*, 1984 ; EL-SAYED *et al.*, 1992 ; SIBOUKEUR, 2002 ; CHETHOUNA *et al.*, 2018) , serait due à la présence des protéines lactosériques décrites précédemment (Lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine...).

Dans ce contexte, certains ont montré l'effet inhibiteur du lysozyme extrait et purifié à partir du lait camelin, sur *Escherichia coli* et *Micrococcus lysodeikticus* en le comparant à celui de l'ovalbumine (DURHAIMAN, 1988). L'efficacité de l'activité des protéines protectrices du lait de chamelle contre *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et rotavirus, a été également signalée (EL-SAYED *et al.*, 1992).

Par ailleurs, on reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antagonistes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des protéines antimicrobiennes (KLAENHAMMER *et al.*, 1994).

- SIBOUKEUR (2011) a montré que la production de bactériocine (type nisine) par *Lactococcus lactis* isolée à partir du lait camelin était plus conséquente en cas de stress de la souche par l'addition de staphylocoques .
- SOUID (2011) a étudié l'effet des bactériocines (type nisine) produite par *Lactococcus lactis* isolé à partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe : *Pseudomonas fluorescens*.
- BOUDJENAH (2012) a montré que le genre *Pseudomonas* constitue la flore psychrotrophe prédominante (37%) dans le lait cru de chamelle entreposé à 4° et 7°C pendant 4 jours.
- KARAM et KARAM (2006) isolent à partir du lait de chamelle une souche *Lactococcus lactis* résistante au sel
- DRICI, 2009 a mis en évidence la diversité génétique des lactocoques issus du lait de chamelle qui se traduit par de nouvelles propriétés intéressantes pour l'industrie laitière (souches ont une forte activité protéolytique et capable de fermenté le citrate).

1.5. Microflore du lait

Le lait de chamelle peut être ensemencé par de nombreuses espèces microbiennes. Pour

certaines, il constitue un bon milieu de culture, ce qui leur permet de s'y développer. Pour d'autres germes banaux ou pathogènes, il n'est qu'un véhicule occasionnel. En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories: la flore saprophyte et la flore contaminante.

1.5.1. Flore saprophyte

Elles peuvent avoir un intérêt hygiénique, technologique ou être indifférentes.

1.5.1.1. Flore lactique

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par ORLA-JENSEN (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (NOVEL, 1993). Les bactéries lactiques sont un groupe de coques, bacilles ou coccobacilles. Leurs principales caractéristiques sont les suivantes : GRAM positif, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotoles, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase, ne possède pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase) (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; CARR *et al.*, 2002 ; AXELSSON, 2004).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles). Toutefois, de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (BELARBI, 2011).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose (figure 1)
- hétérofermentaires facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique (figure 1)
- hétérofermentaires strict : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (figure 1)

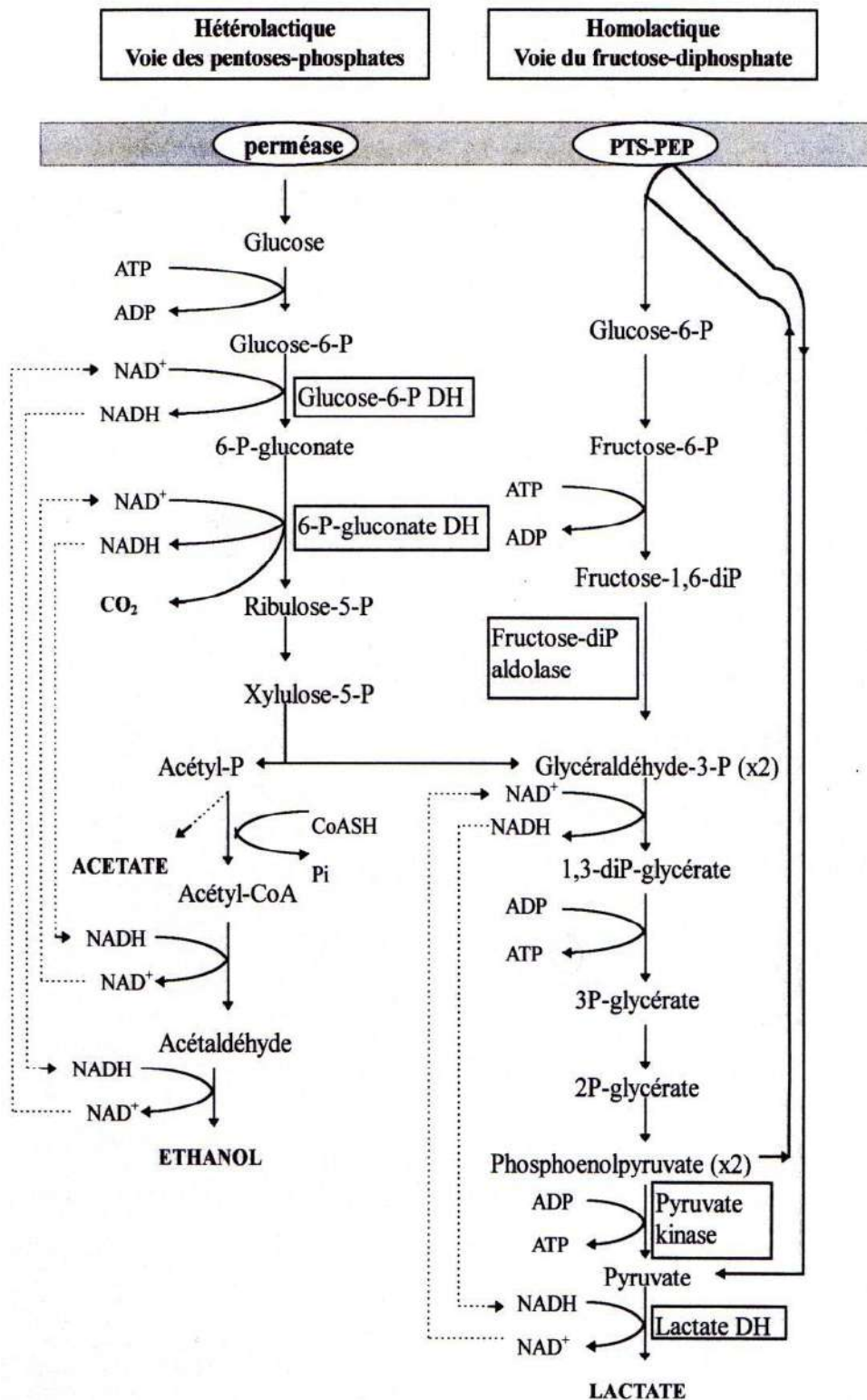


Figure 1 : Voie fermentaire des bactéries lactiques (DESMAZEAUD et DE ROISSART, 1994).

1.5.1.1.1. Classification des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par ORLA-JENSEN.

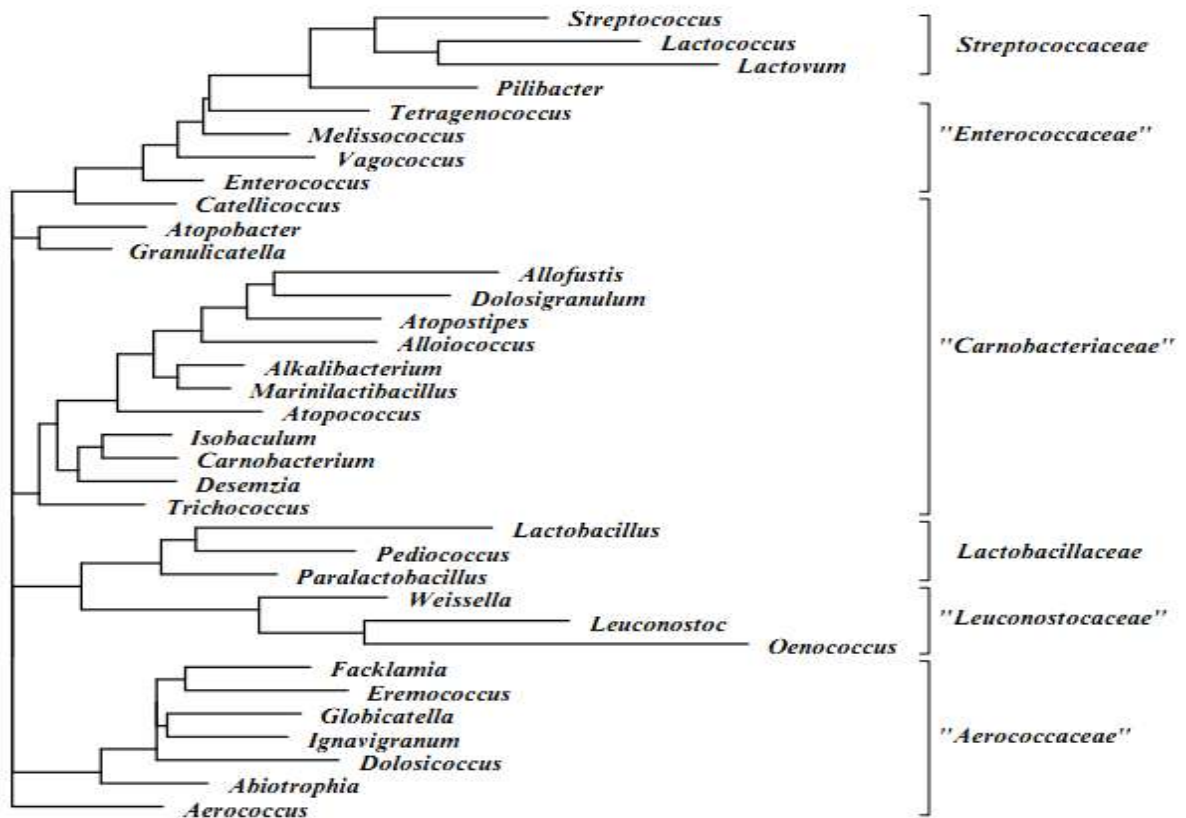


Figure 2 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre des «Lactobacillales» au sein de la classe «Bacilli» (Vos et al., 2009).

Selon la version de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les LAB sont regroupées en un seul ordre (*Lactobacillales*) qui comprend six familles (*Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae*) contenant 35 genres (Figure 2) (VOS *et al.*, 2009).

Douze genres sont considérés comme étant des bactéries lactiques principales et sont associés aux aliments: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* et *Weissella* (STILES et HOLZAPFEL, 1997; KOORT, 2006).

A/ Genre lactobacillus

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des lactobacillaceae. Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en **G + C** qui peut varier de 32 à 53 % (SCHLEIFER et STACKEBRANDT, 1983 ; PILET et *et al.*, 2005) (photo1)

La classification remaniée par KANDLER et WEISS (1986) les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

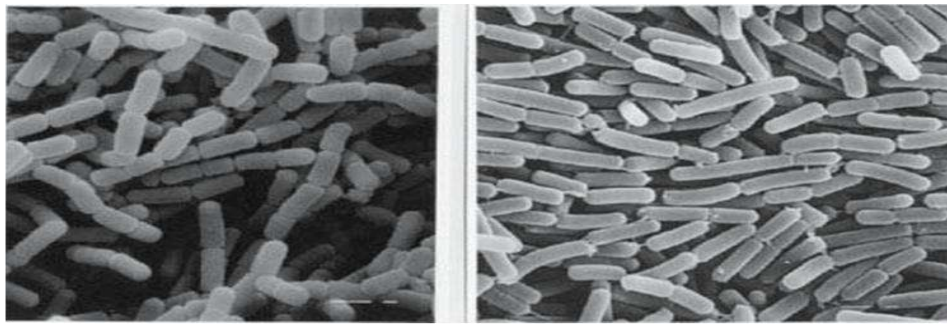
- groupe **I** : anciennement appelé *Thermobacterium* regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique. Elles se développent à 45°C mais pas à 15°C. Leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades (BOTTAZZI, 1988) (tableau V et photo 1B).
- groupe **II** : anciennement appelé *Streptobacterium*. rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (mais pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate), celle des pentoses et du gluconate peuvent être dégradés par la voie hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphokétolase inductible. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments (BOTTAZZI, 1988) (tableau V et photo 1A).
- groupe **III** : anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. La fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO₂, celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ces bactéries possèdent une phosphokétolase (tableau V). C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. Les cellules sont courtes, droites et séparées (BOTTAZZI, 1988) (photo 1 C) et (tableau V)

Tableau V : Classification des groupes du genre *Lactobacillus* (AXELLSSON, 1998)

Caractéristiques	Group I, homofermentaires Obligatoires	Group II, hétérofermentaires Facultatifs	Group III, hétérofermentaires Obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	+
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
Espèce	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb.</i> <i>buchneri</i> <i>Lb.</i> <i>fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

***FDP** : Fructose 1-6 diphosphate aldolase

Les Lactobacilles, de par leur variété, sont présents dans des milieux très différents cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'Homme, produits végétaux, lait et produits laitiers (différents type de fromages), produits carnés, poissons marinés ou fumés.



A

B



C

Photos 1 : Morphologie de A: *Lactobacillus casei* and B: *Lactobacillus acidophilus*

C : *Lactobacillus brevis*

B/ Carnobacterium

Ce genre a été créé par COLLINS *et al.*, (1987). Ce sont des bacilles hétérofermentaires souvent rencontrés dans les viandes de bœuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température (NOVEL, 1993 ; JOFFRAUD *et al.*, 2006). Ils sont originellement décrits comme *Lactobacillus mobile*, *Lb. gallinarum*, *Lb. divergens*, *Lb. piscicola* (NOVEL, 1993). Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre appelé *Carnobacterium*. Morphologiquement proches des lactobacillus (petits bâtonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes), ils s'en différencient par leur production de l'acide L(+) lactique et leur incapacité à se développer dans les substrats à base d'acétate. En général, les *Carnobacterium* peuvent croître à un pH relativement élevé (pH9) tandis que les lactobacilles ne peuvent pas s'y développer (SCHILLINGER et LUCKE, 1987). La croissance est possible à 0°C et 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de NaCl 8% (LARPENT, 1996). Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% (DELLAGLIO *et al.*, 1994). Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés, ou de

produits de la mer, saumon fumé mais certains ont également été isolés de fromages.

C/ *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus*

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus* (AXELSSON, 2004). Ce sont des coques en paire ou en chaîne. Leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acide L(+) lactique. Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield.

- **Le genre *Streptococcus*** comprend la majorité des espèces de streptocoques. Ces organismes ont un contenu en G+C de 35 à 46% (PILET *et al.*, 2005). Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques. Le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes, hémolytiques (hémolyse β) comme *Streptococcus pyogenes* ; d'autres streptocoques oraux (α - ou non-hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'Homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qu'ils ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » (SCHEILFER, 1987) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp. salivarius* (HADDIE., 1995)

- **Le genre *Lactococcus*** appartient au groupe N de Lancefield, représente les streptocoques dits « lactiques ». SCHLEIFER *et al.* (1985), se fondant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (NOVEL, 1993).

Les lactocoques sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, mais seuls les espèces *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisées dans la technologie laitière. Trois sous-espèces de *L. lactis* peuvent être distinguées : *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *Hordniae* antérieurement classifié dans le genre *Lactobacillus* (JOMAA, 2007). Cependant, seules les deux premières interviennent dans la plupart des produits laitiers (Photo 2).

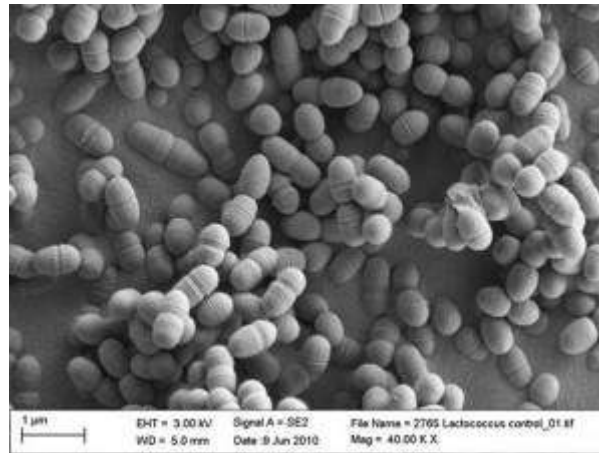


Photo 2 : Morphologie en microscopie électronique de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

- **Le genre *Enterococcus*** rassemble la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type α , β , et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 % NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement (GUIRAUD,2012). Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* auparavant (*Streptococcus faecalis*) et *En. durans* et *En. bovis*. Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produit végétaux, sol, produits laitiers (GIRAFFA *et al.*, 1997). Les entérocoques joueraient un rôle important dans la maturation des fromages (GALVEZ, 2012)
- **Le genre *Vagococcus*** sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras (HO, 2008).

D/ *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* :

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide D(-) lactique.

- **Le genre *Leuconostoc*** : a été défini par VAN THIEGHEM en 1878. Ce genre a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leurs contenu en G+C sont assez voisins (37 à 45%) (Garvie, 1986). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ces espèces sont caractérisées par la production de diacétyle à partir du citrate et parfois par la synthèse de dextrans et de

levanes extracellulaires en présence de saccharose (NOVEL, 1993). Les études phylogénétiques des leuconostocs montrent une diversité dans ce genre (EOM *et al.*, 2007). En général les leuconostocs sont utiles dans différents types de fromages (DEVOYOD et POUILLAIN, 1988 ; OGIER *et al.*, 2008) où ils facilitent les ouvertures (pores) par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement l'espèce *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, dans la fabrication de l'ensilage et celle des végétaux fermentés (olives, choucroute...etc.) (HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004) (Photo 3).

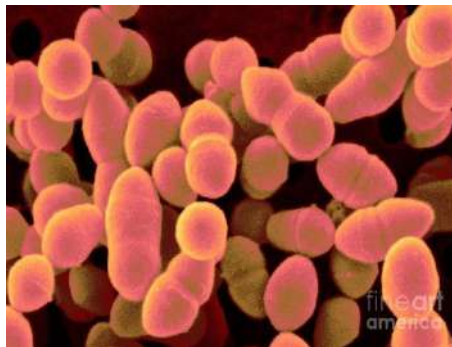


Photo3: Morphologie en microscopie électronique de *Leuconostocs lactis*

- **Le genre *Oenococcus* :** Comporte les espèces de bactéries *Oenococcus oeni* (anciennement *Leuconostoc oenos* remplacé en 1995) (DICKS *et al.*, 1995) et *Oenococcus kitaharae* ((ENDO et OKADA 2006) 2006). Il appartient à la famille des *Leuconostocaceae*. Comme son nom l'indique, *Oenococcus oeni* a une importance majeure en œnologie, où elle est la bactérie principale responsable de la fermentation malolactique.
- **Le genre *Weissella* :** Les études de (MARTINEZ-MURACIA et COLLINS, 1990) et (COLLINS *et al.*, 1993) permis de grouper certains lactobacilles hétérofermentaires (*Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens*) avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella*.

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (WALTER *et al.*, 2001).

E/ Aerococcus, Pediococcus et Tetragenococcus:

- **Le genre *Pediococcus* :** sont formés de cellules groupées groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles, homofermentaires, et le plus souvent incapables d'utiliser

le lactose. Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicum*, *P. inopinatus*, *P. parvutus*, *P. pentosaceus* et *P. urinaeequi*. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+) et sont aussi caractérisés par le GC% de leur ADN (34-42%). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P. damnosus*). Les *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (GURIRA *et al.*, 2005 ; GONZALEZ *et al.*, 2007).

- **Le genre *Aerococcus*** : a été proposé en 1953 pour classer des coques à Gram positif, catalase négative, aéro-anaérobies, se différenciant des streptocoques par son mode de groupement. Les souches d'*Aerococcus* ssp se présentent sous la forme de coques à Gram positif, immobiles, groupés en tétrades ou en amas. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme un simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale (VELA *et al.*, 2007).
- **Le genre *Tetragenococcus*** : regroupe des souches étroitement apparentées à l'espèce *Pediococcus halophilus*. Une seule espèce a été récemment reconnue, il s'agit de *Tetragenococcus halophilus* (COLLINS *et al.*, 1990). Il a été démontré, qu'en plus de leur tolérance extrême au sel (>18% de NaCl), qui les distingue des autres bactéries lactiques ; *Tetragenococcus* a besoin de sel pour sa croissance, généralement 5% de NaCl (HANAGATA *et al.*, 2003 ; JUSTE *et al.*, 2008), c'est la raison pour laquelle cette espèce s'est avérée très importante dans la fabrication des produits fermentés et surtout ceux contenant une concentration élevée en sel.

F/ Bifidobacterium:

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*), la forme de leurs cellules est très irrégulière (cellules courtes, conoïdales, ramifiées, spatulées, isolées ou en chaîne, disposées en V ou en palissade) (LARPENT , 1996 ; PILET *et al.*, 2005). Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur contenu G+C (55-67%) et la présence d'une fructose-6-phosphocétolase. En fait, *Bifidobacterium* permet de fermenter les hexoses en produisant plus d'acide acétique que d'acide lactique (rapport 3:2), de faibles quantités d'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les

rapprocher du groupe des bactéries lactiques (PILET *et al.*, 2005). Leur température de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Ils sont isolés à partir de la flore intestinale du nouveau-né. On les retrouve aussi dans l'intestin de l'Homme et de nombreuses espèces animales. Ils sont utilisés dans la fabrication du yaourt et produits laitiers fermentés (probiotiques), Leur présence entraîne une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal grâce à la présence d'un facteur bifidogène (SONDERGAARD, 2005).

1.5.1.1.2. Bactéries lactiques et fermentations alimentaires

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (HOLZAPFEL, 2002).

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés comme le yaourt, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie traditionnelle (DESMAZEAUD, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production de produits fermentés. Elles permettent de changer la saveur et la texture de l'aliment. Ces changements sont dus notamment à l'acide lactique produit au cours de leur croissance. D'autre part, les BL produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments (tableau III).

Tableau VI: Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire, exemples d'espèces prédominantes d'après MCKAY et BALDWIN (1990)

Applications	Espèces utilisées
Fermentations des végétaux	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. Plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp <i>latis</i> biovar <i>diacetyllactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>Ln.lactis</i> , <i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. Acidophilus</i>

Le domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques est l'industrie laitière. Les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (PILET *et al.*, 2005). Ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage. Les bactéries lactiques sont souvent utilisées en association, par exemple la fabrication du yaourt fait appel aux deux espèces lactiques : *Lb delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Dans les produits carnés, les bactéries lactiques améliorent la qualité hygiénique et marchande en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables. Les bactéries lactiques interviennent aussi dans la préparation de nombreux produits végétaux fermentés. L'exemple le plus connu est la choucroute, elle fait intervenir quatre espèces lactiques : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Pediococcus damnosus*.

1.5.1.1.3. Bactéries lactiques et santé humaine

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'Homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki, subsp bulgaricus* (SALMINEN *et al.*, 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anticancérogènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

1.5.1.1.4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Cette activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés tels que : l'acide lactique et autres acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, les bactériocines...etc.

A/. Acides organiques

L'effet antimicrobien primaire exercé par les bactéries lactiques est la production d'acide lactique et l'abaissement consécutif du pH (DAESCHEL, 1989). Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (LIU, 2003).

L'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (KLAENHAMMER, 1993; JANSSEN *et al.*, 2007).

B/. Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes (ZALAN *et al.*, 2005). En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition, se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (ZALAN *et al.*, 2005).

C/. La reutérine

La reutérine est un produit de fermentation du glycérol. Elle est produite par quelques souches de bactéries lactiques telles que *Lactobacillus reuteri* (CHUNG *et al.*, 1989), *Lactobacillus brevis* (SCHUTZ et RADLER, 1984), *Lactobacillus buchneri* (SCHUTZ et RADLER, 1984), *Lactobacillus collinoides* (CLAISSE et LONVAUD-, 2000), elle a un spectre très large d'activité anti-microbiennes (antibactérien, antifongique, antiviral) (AXELSSON *et al.*, 1989). La reutérine (β -hydroxypropionaldéhyde) est une molécule ayant une activité antimicrobienne à large spectre vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire et des microorganismes de détérioration. La reutérine est soluble dans l'eau, résistante à la chaleur, aux enzymes protéolytiques et lipolytiques. Elle est stable sur une large gamme de pH. ARQUES *et al.*, 2011) montre un effet synergique fort de la reutérine en association avec la nisine contre *Staphylococcus aureus* et avec la lacticine 481 et l'entéroïne AS-48 sur *Listeria monocytogenes*.

D/. Le diacétyle

C'est un produit issu du métabolisme du citrate. Elle est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. L'effet antimicrobien du diacétyle est connu depuis les années 30 (JAY, 1982). Il inhibe la croissance des bactéries à GRAM négatif en interagissant avec une protéine fixatrice d'arginine, ce qui affecte l'utilisation de l'arginine (JAY, 1986). Ce même auteur montra que les bactéries à GRAM négatif sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries à GRAM positif. Le diacétyle à 200 µg/ml inhibe les bactéries à GRAM négatif, mais n'inhibe celles à GRAM positif qu'à 300 µg/ml. La production de diacétyle est faible durant la fermentation lactique (4 µg/ml sont produits par *Lactococcus lactis ssp.lactis biovar diacetylactis*). Les niveaux acceptables de diacétyle sont de 2 à 7 µg mL⁻¹ ; son utilisation pratique en tant que conservateur alimentaire est limitée ; cependant, le diacétyle pourrait agir en synergie avec d'autres facteurs antimicrobiens et contributeur aux systèmes de conservation combinés dans les aliments fermentés (JAY, 1986).

CAPLICE et FITZGERALD, (1999) indiquent que les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm et supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm). LACIOTTI *et al.*, (2003) montrent que cent (100) ppm de diacétyle, avaient un effet bactéricide contre *E.coli* et *s.aureus*. AMMOR *et al.*, (2006) indiquent que les souches de *Listeria* sont inhibées à partir d'une concentration de 344 µg.mL⁻¹.

E/. Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaires des espèces de *Leuconostoc* et de *Lactobacillus* (MERZOUK, 2015), il peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique. L'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane peut alors entraîner un dysfonctionnement de la perméabilité (LEONARD, 2013).

Il peut également inhiber efficacement, la croissance de nombreux micro-organismes d'altération des aliments, en particulier des bactéries psychrotrophes GRAM négatives

Le degré d'inhibition du CO₂ varie considérablement entre les organismes. Il possède une forte activité antifongique (AMMOR *et al.*, 2006 ; LEONARD, 2013).

F/. Les bactériocines

Les bactéries lactiques produisent une variété de peptides ou des protéines ayant une activité antibactérienne. Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de

KLAENHAMMER (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou des complexes protéiques.

Leur spectre d'action envers des espèces, pathogènes en l'occurrence, est étroit et est limité aux espèces taxonomiquement proches du producteur. Pour se protéger contre sa propre bactériocine, une bactérie productrice synthétise une protéine d'immunité (HECHARD *et al.*, 1993). Elles représentent une large classe de substances antagonistes qui varie considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (KLAENHAMMER, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries à GRAM⁺. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries à GRAM⁻ n'a été décrite, la membrane externe des bactéries à GRAM⁻ ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (DORTU et THONART, 2009). Néanmoins, les travaux de SOUID *et al.*, 2015 ont montré un effet antagoniste des bactériocines type nisine sur des *pseudomonas fluorescens*. Elles présentent un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Thermostables, elles sont inactivées par les protéases du fait de la rapidité de leur digestion dans le tractus digestif humain (LABIOUI *et al.*, 2005 ; PARADA *et al.*, 2007).

Ces substances représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et à inhiber la croissance des germes pathogènes (DORTU et THONART, 2009 ; BENHAMOUCHE *et al.*, 2012).

En agro-alimentaire seule la nisine synthétisée par l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée comme additif alimentaire afin d'inhiber la croissance des espèces nuisibles responsables des intoxications (DOUMANDJI *et al.*, 2010). Son efficacité a été mise en évidence contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutiricum* (KALCHAYANAND *et al.*, 2008 ; SOUID, 2011 ; SIBOUKEUR, 2018).

F.1 / Classification des bactériocines

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines des bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent (BELARBI, 2011). D'après (KLAENHAMMER, 1993), leur structure primaire a permis de définir une classification en quatre classes :

➤ Classe I - Les lantibiotiques

Il s'agit de peptides de taille réduite (< à 5 kD), stables à la chaleur. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe **Ia** qui contient des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe **Ib** qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. (MC AULIFFE et HILL, 2001; TWOMEY *et al.*, 2002). La nisine, la subtiline, la duramycine ainsi que la cytolysine L1 sont des exemples de lantibiotiques

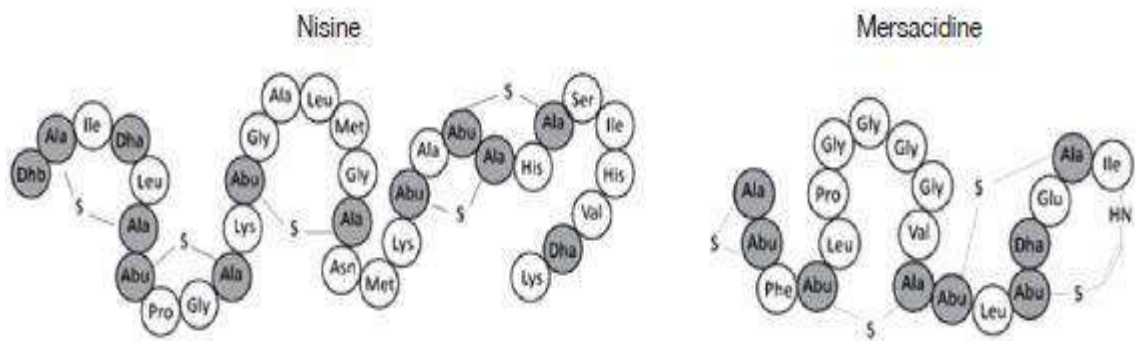


Figure 3: Séquence et structure de lantibiotiques de type A (nisin) et B (mersacidin) (DORTU et THONART, 2009)

➤ Classe II

La classe II est caractérisée par des petits peptides (< 10 kDa). Ces peptides demeurent également stables après un traitement à la chaleur et sans modification post-traductionnelle. **Sous classe IIa :** bactériocines actives contre l'espèce *Listeria monocytogenes* (CENATIEMPO *et al.*, 1996 ; AXELSSON, 2004). Ils contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (FIMLAND *et al.*, 2000 ; RICHARD *et al.*, 2006). Ces bactériocines semblent par ailleurs avoir une meilleure activité antimicrobienne, un spectre d'action plus large et une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures (FIMLAND *et al.*, 2000 ; DRIDER *et al.*, 2006 ; RICHARD *et al.*, 2006).

Sous classe IIb : Les bactériocines, communément appelées « two-peptides », sont formées de deux peptides différents, α et β , dont l'activité antimicrobienne optimale nécessite la présence des deux peptides complémentaires, le plus souvent en quantité équimolaire. Dans certains cas, ces peptides peuvent être actifs individuellement comme c'est le cas de la lactacine F des plantaricines EF et JK (MAKHLOUFI, 2011).

Sous classe IIc : contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (DORTU, 2009).

➤ **Classe III**

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille. Il s'agit de protéines dont la masse est supérieure à 30 kDa et thermosensible. Ils sont en effet détruits par un chauffage de 10 à 15 min à 60°C.

La plupart d'entre elles sont produites principalement par des souches de lactobacilles. L'helveticin est produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A est produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A est produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B est produite par *Streptococcus milleri* (NILSEN *et al.*, 2003 ; PAPAGIANNI, 2003 ; NIGUTOVA *et al.*, 2007) (tableau VII).

Tableau VII: Liste des bactériocines appartenant à la classe III (KLAENHAMMER, 1993; RILEY et WERTZ, 2002)

Bacteriocin	Producing strain(s)	Antimicrobial activity
Acidophilucin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> and <i>Lb. helveticus</i>
Caseicin	<i>Lb. casei</i> B40	<i>Lb. casei</i>
Helveticin J	<i>Lb. helveticus</i> 481	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> and <i>lactis</i>
Helveticin V-1829	<i>Lb. helveticus</i> 1829	<i>Lb. helveticus</i> and <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
Lactacin A	V. <i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
Lactacin B	VI. <i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> and <i>delbrueckii</i>

➤ Classe IV

Cette classe englobe les bactériocines qui nécessitent une partie non protéique pour être active. Cette classe comporte des bactériocines complexes qui exigent des carbohydrates ou des fractions lipidiques pour leur activité biologique (MORISSET *et al.*, 2005 ; SAVADOGO *et al.*, 2006). Ces bactériocines présentées par KLAENHAMMER (1993) a été contestée par la suite par de nombreux auteurs, puisque aucun de ces peptides n'a été co-purifié avec sa partie glucidique ou lipidique (NES *et al.*, 1996).

F.2 / Mécanismes d'action des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (NES *et al.*, 2007). C'est le mode d'action le plus répandu, surtout chez les bactériocines de la classe II. La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible), c'est le cas notamment de la mersacidine (BROTZ *et al.*, 1998) et de la nisine (VAN de VENET *et al.*, 1991) ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (BROGDEN, 2005), les bactériocines vont par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (ECKER, 1992; ENNAHAR *et al.*, 2000; PESCHEL, 2002; BROGDEN, 2005).

Ainsi, l'action de la bactériocine se traduit par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique (KLAENHAMMER, 1993; CENATIEMPO *et al.*, 1996; ENNAHAR *et al.*, 2000). KOO *et al.*, (2001) ont montré que la perméabilisation seule de la membrane de *S. aureus* par la gramicidine D et la protamine ne conduisait pas à la mort de la cellule. Différentes cibles peuvent être attaquées, ce qui contribue à perturber le fonctionnement cellulaire. L'épidermine, la mersacidine, ainsi que la nisine (BROTZ *et al.*, 1998) se lient au lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse du peptidoglycane. Elle s'internalise et forme des pores tout en bloquant la fonction du lipide II (TAALE *et al.*, 2016). D'autres peptides antimicrobiens peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (PATRZYKAT *et al.*, 2002), ou inhiber la synthèse protéique ou encore inhiber certaines fonctions enzymatiques (BROGDEN, 2005).

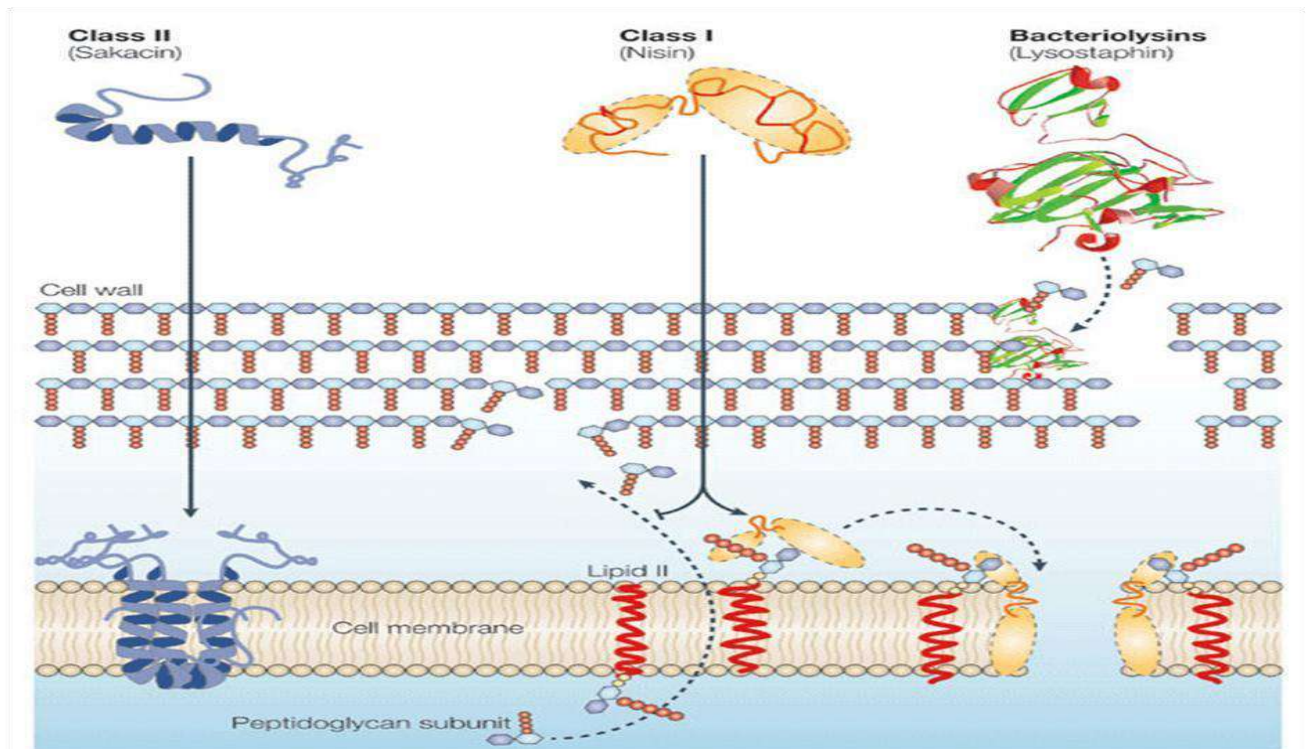


Figure 4: Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (PAUL *et al.*, 2005)

F.3/ Spectre d'activité des bactériocines

La plupart des bactériocines de la classe I, ont un spectre d'activité relativement large, touchant à la fois à des bactéries lactiques elles-mêmes mais aussi des espèces pathogènes, tel que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Clostridium botulinum*. Plusieurs bactériocines dans cette classe, tel que la nisine et la thermophiline 13, empêchent la germination des spores de *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum*. La plantaricine LP84 (produite par *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084) a montré un antagonisme contre *Escherichia coli* (SUMA *et al.*, 1998).

La plupart des bactériocines de la classe IIa, ont des spectres d'activité étroits et inhibent seulement des bactéries à GRAM positif apparentées. En général, les membranes du genre *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* sont sensibles à cette classe, et les membranes du genre *Lactococcus* en sont résistantes. Quelques unes des bactériocines IIa, tel que la pediocine PA-1, possèdent des spectres inhibiteurs assez larges, pouvant inhiber des bactéries, tel que *S. aureus*, et des cellules végétatives de *Clostridium* sp. et de *Bacillus* sp. Quelques bactériocines de la classe IIa, tel que la mundticine produite par *Enterococcus mundtii*, empêche la germination des spores de *Clostridium botulinum*. Les bactériocines de la classe IIa, sont généralement actives contre *Listeria monocytogenes* (ENNAHAR *et al.*, 2000 ; HAMMI, 2016).

Dans une comparaison directe, Il a été montré que la nisine a un spectre d'inhibition plus large contre *Listeria monocytogenes* que la pediocin PA-1 (ENNAHAR *et al.*, 2000).

F.4/ Applications et intérêts des bactériocines

* Applications dans le domaine agro-alimentaire

Plusieurs travaux ont permis de montrer l'efficacité des bactériocines ou de souches productrices de bactériocines dans différentes matrices alimentaires. En 1998, ENNAHAR *et al.*, ont montré que *Listeria monocytogenes*, présente dans le fromage Munster, était inhibée par l'addition de *Lactobacillus plantarum* WHE 92, une souche productrice de pédiocine PA-1. La même souche de *L. monocytogenes* a également été inhibée par l'enterocine 81 produite par *Enterococcus faecium* WHE 81. IZQUIERDO *et al.*, (2009), en utilisant cette même souche d'*Enterococcus faecium* WHE 81, comme culture de surface au début de la maturation du fromage Munster ont également empêché le développement de *L. monocytogenes*. De même, il a été démontré que la pédiocine PA-1 incorporée dans un film d'emballage permet de réduire significativement la charge initiale de *Listeria monocytogenes* sur la surface de la viande (WORAPRAYOTE *et al.*, 2013). De leur côté, ANANOU *et al.*, (2010), en additionnant l'entérocin AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé, ont pu inhiber la prolifération de *L. monocytogenes* et réduire progressivement la population de *S. aureus*.

MARTINEZ *et al.*, (2015) ont montré l'inhibition de la croissance de deux souches de *Listeria monocytogenes* (4b et ½ a) dans un fromage à tartiner en utilisant la souche *Lactobacillus sakei ssp.sakei* 2a, présentant une bonne capacité bactériocinogénique et probiotique ainsi qu'une adaptation à la matrice laitière testée. Cette même souche, encapsulée dans des nano-vésicules liposomiques et introduite dans du lait de chèvre a retardé la croissance de *L. monocytogenes* pendant plusieurs jours (MALHEIROS *et al.*, 2016). De leur côté, CASBURI *et al.*, (2016), en utilisant la souche *Lactobacillus curvatus* 54M16, une souche multi-productrice de bactériocines (les sakacines X, T et P), ont montré une activité inhibitrice permettant l'amélioration de la qualité sanitaire de saucisses fermentées traditionnelles. En effet, ces trois sakacines ont permis l'inhibition des souches pathogènes testées telles que *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Cependant, aucune bactérie à GRAM négatif n'a montré de sensibilité à ces bactériocines. L'utilisation de la technologie des barrières Hurdle Technology qui consiste en une combinaison de bactériocines avec d'autres méthodes de conservation des aliments a donné des résultats prometteurs (MILLES *et al.*, 2011). En effet, cette technologie permet de minimiser le développement des souches résistantes, dans la mesure où les peptides antimicrobiens ont un effet additif ou synergique lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec des traitements physiques par exemple (GALLVEZ *et al.*, 2008 ; MILLES *et al.*, 2011). Ainsi, un traitement à haute pression hydrostatique

combiné à l'utilisation de bactériocines a montré d'importants dommages de la membrane cytoplasmique de la population microbienne cible (GALVEZ *et al.*, 2007). En outre, les bactériocines ont une plus grande possibilité de cibler les agents pathogènes à GRAM négatif en présence des agents chélatants. Ainsi, l'application de la nisine avec de l'EDTA a inhibé efficacement *E.coli*, *Salmonella spp* et *L. monocytogenes* (HAMMI, 2016).

Plusieurs autres travaux des applications alimentaires des bactériocines combinées à d'autres barrières chimiques ont été réussies, telles que : la nisine Z combinée au thymol pour inhiber *L. monocytogenes* (ETTAYEBI *et al.*, 2000), l'enterocine AS-48 combinée avec de NaCl pour inhiber *S. aureus* (ANANOU *et al.*, 2010).

*** Applications dans le domaine médicale**

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 25 000 décès annuels en Europe sont attribués à l'émergence progressive de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (TATTEVIN *et al.*, 2014). Compte tenu de l'importance de ce problème, les recherches s'intensifient en direction de substances dotées d'activités antibactériennes capables d'aider à la lutte contre les souches multi-résistantes. A ce titre, les bactériocines produites par les bactéries lactiques semblent être des molécules de choix (NETTLES et BAREFOOT, 1993). Leur activité antimicrobienne importante *in vitro* et *in vivo*, la variété de spectres d'activité qu'elles offrent, leur faible toxicité, et la capacité de certains probiotiques à en produire *in vivo* chez l'Homme font que les peptides antimicrobiens peuvent constituer une alternative aux antibiotiques (COTTER *et al.*, 2013). Ainsi, des tests *in vivo* effectués chez des chiens ont montré l'inhibition par la nisine de biofilms de *Staphylococcus* ou de *Streptococcus* responsables des infections de plaques dentaires et des gingivites (HOWELL *et al.*, 1993; TATTEVIN *et al.*, 2014).

Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) constituent depuis longtemps un problème majeur, en raison d'infections nosocomiales cutanées (TAYLOR *et al.*, 1992). Or, plusieurs bactériocines ont montré des effets bactéricides contre ces SARM, notamment, la lacticine 3147 (GALVIN *et al.*, 1999) et la mersacidine (SASS *et al.*, 2008). Il s'agit là d'une voie de recherche prometteuse, bien qu'une récente étude ait démontré que les staphylocoques ont pu développer des mécanismes de résistance pour échapper à l'activité bactéricide de ces peptides antimicrobiens (JOO et OTTO, 2015). Une autre étude a permis de prévenir le développement de listériose chez des patients à risque, par l'administration d'un probiotique, *Lactobacillus salivarius* UCC118, produisant la bactériocine UCC118 de classe IIb (COTTER *et al.*, 2013).

F.5/ Etat des lieux des utilisations

Les conditions de croissance de la souche productrice, l'action de la bactériocine produite contre les bactéries indésirables, ainsi que les effets éventuels sur les ferments utilisés sont les principales caractéristiques à prendre en considération lors de la sélection de souches productrices de bactériocines pour des applications dans l'industrie alimentaire (MUNOZ *et al.*, 2007).

Les bactériocines peuvent alors être incorporées directement dans les aliments selon différentes formulations : une préparation de bactériocines sous forme purifiée ou semi purifiée lyophilisée, ou alors un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice comme c'est le cas de la pédiocine PA-1. Il s'agit d'une bactériocine de sous-classe IIa produite par une souche de *Pediococcus acidilactici* et commercialisée sous le nom d'Alta 2341 (HAMMI, 2017). Son utilisation est couverte par plusieurs brevets américains et européens (ENNAHAR *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2002).

Les bactériocines peuvent également être incorporées indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production in situ), en substituant tout ou une partie du ferment (COTTER *et al.*, 2005). C'est l'approche la plus utilisée (PEREZ *et al.*, 2014). Cette application avec production in situ offre plus d'avantages par rapport à une utilisation ex situ de par son efficacité et son faible coût (ROSS *et al.*, 2000; LEROY *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut GRAS (Generally Recognized As Safety) par la Food and Drug Administration (FDA) (MECHAI, 2009). Leur utilisation en tant que ferments et producteurs de bactériocines est ainsi très répandue, étant donné qu'elles ne nécessitent pas l'obtention d'une autorisation réglementaire particulière (MONTVILLE et WINKOWSKI, 1997).

L'utilisation des cellules immobilisées dans des billes d'alginate permet d'améliorer la survie des bactéries productrices et la stabilité des bactériocines produites (GBASSI *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2015; NARSAIAH *et al.*, 2015).

Des microsomes, minuscules réservoirs contenant la bactérie productrice, assurent la libération progressive de la bactériocine tout en la protégeant des protéases et des inactivations dues aux interactions avec les aliments (MAURIELLO *et al.*, 2004).

Enfin, un autre moyen de diffusion est l'enrobage de la surface des emballages alimentaires par des bactériocines (KIM *et al.*, 2002; GALVEZ *et al.*, 2007; DJENANE 2009 WORAPRAYOTE *et al.*, 2013).

1.5.2. Flore contaminante

Elle est composée de la flore d'altération et de la flore pathogène.

1.5.2.1 Flore d'altération

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotrophes, les levures et moisissures (DIENG, 2001).

1.5.2.1.1 Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries est capable de résister aux traitements thermiques usuels, utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé. On distingue:

- La flore thermorésistante totale, définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63 °C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation HTST (72 °C pendant 15 secondes).
- La flore moyennement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage pendant 12 secondes.
- La flore fortement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Elle comprend notamment les spores bactériennes, qui nécessitent des températures supérieures à 100 °C.

Les composantes de cette flore sont : *Micrococcus*, *Microbactérium* et *Bacillus* dont l'espèce *Bacillus cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation. Le genre *Bacillus* réalise en outre, des activités enzymatiques lactiques pouvant être responsables de l'acidification, de la coagulation ou de la protéolyse des laits de longue conservation.

1.5.2.1.2. Les coliformes

D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétérofermentaire. Ils peuvent se retrouver dans tous les types de lait. Ce sont des germes qui vivent dans le tube digestif de l'Homme et des animaux. Leur présence est un signe de contamination lors de la traite et pendant les manipulations et transvasements multiples que subissent les produits avant la commercialisation (BA DIAO ,2000). La pollution par les coliformes est très fréquente ; même légère, elle présente un risque. Des coliformes banaux absorbés en quantité massive peuvent déclencher des troubles gastro-intestinaux.

1.5.2.1.3. Les psychrotrophes

Le terme « psychrotrophe » désigne des micro-organismes qui ont la faculté de se développer à une température inférieure à 7°C, indépendamment de leur température de croissance plus élevée (LAHELEC et COLIN, 1991). Parmi les micro-organismes qui composent ce groupe, nous pouvons citer les genres à :

- GRAM (-) : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Serratia*, etc ...
- GRAM (+) : *Micrococcus*, *Corynebactérium*, etc ...

En général dans le lait, c'est le genre *Pseudomonas* qui domine. Il est fortement psychrotrophe et il se multiplie par 100 en 48 heures à +4°C (MONSALLIER, 1994). Ces germes produisent des lipases et des protéases thermorésistantes ayant pour conséquence l'apparition de goûts très désagréables dans les produits laitiers: goût amer, rance, putride... etc .

1.5.2.1.4. Levures et moisissures

Les levures et les moisissures sont des cellules eucaryotes. Regroupées sous le vocable de flore fongique, elles peuvent être retrouvées aussi bien dans le lait cru, le lait en poudre ainsi que dans tous les autres produits laitiers (ALAIS, 1984).

- **Les levures**

De forme arrondie ou ovale, volumineuses ou unicellulaires, les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatisation, elles sont aérobies facultatives (ROZIER, 1990). Par contre, d'autres levures - *Kluyveromyces lacfis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*,- *Saccharomyces lactis*. peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments. Les levures supportent des pH de 3 à 8 avec un optimum de 4,5 à 6,4. Ce qui explique leur présence dans le lait cru comme dans le lait caillé (BOUIX et LEVEAU, 1988). Elles entraînent des altérations rendant le produit final indésirable : aspect trouble, odeurs ou goûts désagréables, gonflement des produits ou de leur emballage.

- **Les moisissures**

Les moisissures sont en général plus complexes dans leur morphologie et dans leur mode de reproduction. Elles peuvent être utiles ou indésirables en industrie alimentaire Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées en utilisant le lactose. Cette propriété leur confère une utilité incontestable en fromagerie. C'est ainsi que le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* sont utilisés dans la fabrication de divers types de fromages célèbres. Mais le développement excessif de certaines moisissures comme *Géotrichum* à la surface des fromages, les rend glaireuses et coulantes, ce qui les déprécie

fortement. Certaines moisissures élaborent des mycotoxines thermostables et liposolubles donc difficiles à éliminer une fois formées. Dans ce contexte, WISEMAN et APPLEBAUM (1983), signalent la résistance de l'aflatoxine M₁, élaborée par *Aspergillus flavus*, à la pasteurisation.

1.5.2.2. Bactéries pathogènes

Le lait et les produits laitiers, de même que ceux ayant subi un traitement d'assainissement, peuvent contenir des germes pathogènes pour l'Homme. L'animal, l'Homme et l'environnement peuvent être à l'origine de cette contamination. Différentes espèces bactériennes sont capables de pénétrer dans la mamelle par le canal du trayon et sont excrétées dans le lait. Certains de ces germes en particulier, les streptocoques et staphylocoques, provoquent des mammites avec contamination du lait (KAGEMBEA, 1984).

1.5.2.2.1. Les staphylocoques

Ils sont fréquemment retrouvés dans le lait et parfois en nombre important. L'origine de la contamination est la mamelle et plus fréquemment l'Homme. Leur fréquence tend à augmenter du fait de leur antibiorésistance. Ils provoquent, par leur production de toxines thermostables, des intoxications de gravité variable pouvant être redoutables (KAGEMBEA, 1984). Les staphylocoques pathogènes ont la particularité de posséder une coagulase, une phosphatase et une DNase thermostable ou thermonucléase. Il faut cependant noter que les staphylocoques non pathogènes sont plus nombreux ; ils sont coagulase (-) et non toxigènes (NDAO, 1996).

Seules certaines souches de staphylocoques appartenant aux espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus intermedius* sont capables de produire des entérotoxines (DEBUYSER, 1991). Les symptômes d'une toxi-infection à staphylocoques, apparaissent 2 à 4 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé. Ils se manifestent par des coliques violentes, accompagnées de nausées et de vomissements suivis d'une diarrhée incoercible avec possibilité de perte de conscience (MAILLOT, 1985).

1.5.2.2.2 Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles, GRAM-, oxydase négative, catalase (+), asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites. Ils sont anaérobies facultatifs (GUIRAUD, 1998) et constituent l'une des plus grandes familles de bactéries. Les entérobactéries sont divisées en deux groupes (2) :

- les lactose (-) : Shigella, Salmonella, Serratia, Proteus, Yersinia ;
- les lactose (+) : Escherichia coli, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia.

a/ Les Salmonelles

sont responsables de nombreuses toxi-infections. En effet, les toxi-infections alimentaires à *Salmonella typhimurium* et *Salmonella enteritidis* ont souvent pour origine la consommation de lait, crème, beurre, crème glacée, etc., n'ayant subi aucun traitement d'assainissement ou recontaminés.

b/ Escherichia coli

dont certaines souches sont entéropathogènes, peuvent être responsables de graves toxi-infections suite à la consommation de produits laitiers et de lait infectés.

1.5.2.2.3 Les Brucelles

Sont souvent à l'origine de la contamination du lait de vache, chèvre et de beaucoup d'autres espèces dans les pays où il n'a pas été effectué de sérieuses campagnes d'éradication. Les brucelles sont néanmoins présentes de façon exceptionnelle dans les laits caillés (SEMASAKA, 1986). Ceci est d'ailleurs rapporté par EZE (1977) qui démontre qu'à pH 4,5 toutes les brucelles sont détruites dans le lait.

1.5.2.2.4 Le genre Listeria

Notamment l'espèce *Listeria monocytogenes*, est un petit bacille à GRAM (+), non capsulé, non sporulé, de mobilité « en pirouette » caractéristique par examen à l'état frais. Elle fait partie des bactéries psychrotrophes pathogènes (EZE, 1977). *Listeria monocytogenes* est couramment retrouvée dans le lait cru. BEERENS et LUQUET (1987) rapportent qu'en France 50 % des échantillons de lait renferment des listérias.

1.6. Traitement de préservation du lait : Pasteurisation du lait camelin

Le lait cru surtout s'il est en vrac, provenant de plusieurs animaux est susceptible de contenir des micro-organismes pathogènes pour l'Homme. A moins qu'on ne soit certain que les animaux producteurs sont parfaitement sains, l'hygiène moderne requiert que le lait cru, et notamment le lait cru en vrac, soit traité de façon à prévenir non seulement son altération rapide mais aussi tout risque de contamination du consommateur.

De nombreuses années d'expérience et d'essais ont montré que le traitement généralement le plus satisfaisant à ces deux fins, celui qui provoque le minimum de changement dans la composition, la saveur et l'acceptabilité du lait, est la pasteurisation (LARPENT, 1997 ; JEANTET et al, 2006).

Si la pasteurisation 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. L'une des raisons principales de cette carence est la relative absence des moyens matériels et humains (laboratoires mobiles, chercheurs...) sur les lieux de collecte, généralement très éloignés des zones urbaines. L'étude réalisée par ABDERRAHMANE (1994) a montré que le lait de chamelle pasteurisé a gagné des parts clientèles sur le lait UHT, grâce à sa qualité organoleptique.

La pasteurisation est une des opérations les plus importantes du traitement du lait. Si elles sont effectuées correctement, ces opérations prolongeront la durée de conservation du lait.

La température et le temps de pasteurisation sont des facteurs très importants que l'on devra choisir avec précision, en fonction de la qualité du lait, de la durée de conservation requise etc. Trois types de pasteurisation sont pratiqués en fonction des couples temps/température : pasteurisation basse (15-30 min/60-65°C), pasteurisation rapide à haute température (HTST) (15-40 sec/70-75°C) et pasteurisation haute (1-2min /85-95°C) (LARPENT, 1997 ; JEANTET et *al*, 2006).

1.6.1. Pasteurisation basse

Le lait chauffé dans une vaste chambre à double paroi chauffée par circulation de vapeur ou d'eau chaude. La température à laquelle le lait doit être porté, puis maintenu pendant au moins 30 minutes, varie de 60°C à 65,5 suivant les pays (c'est-à-dire suivant la conception des marges de sécurité). Le lait est alors refroidi à 10°C ou moins.

1.6.2. Pasteurisation rapide à haute température (High Temperatur Short Time ou HTST)

C'est un procédé continu dans lequel le lait est rapidement porté à 71°- 72°C et maintenu à cette température pendant au moins 15 secondes ; il est ensuite refroidi rapidement à 10°C ou moins. Cette association de température et de temps assure une bonne marge de sécurité ; le chauffage est habituellement obtenu par circulation d'eau chaude et l'échange thermique rapide a lieu à travers des plaques en acier inoxydable ou dans autre type d'appareil, par passage du lait dans un espace annulaire entre des tubes concentriques chauffés par de l'eau qui circule.

1.6.3. Pasteurisation haute

Le lait est chauffé à une température comprise entre 85°C et 95°C pendant 1-2 minute, soit directement par contact direct avec la vapeur soit le plus souvent, pour des raisons énergétiques, indirectement en flux continu (transmission de la chaleur entre les liquides chauffants et le lait par des échangeurs de chaleur tubulaires ou à plaques).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1. Matériel biologique

*Lait de dromadaires

Il s'agit des échantillons du lait collecté, pendant deux saisons (hivers et printemps) à partir de troupeaux de dromadaires (*Camelus dromedarius*) de la population Sahraoui en milactaion vivant en élevage extensif dans des parcours naturelles de trois régions du sud-est Algérien : Ouargla, Taibet et Touggourt. Les échantillons de lait sont conservés dans une glacière contenant un bloc réfrigérant. Ils sont aussitôt transportés au laboratoire où ils seront analysés.

*La souche cible

Pour tester les activités antibactériennes des souches lactiques indigènes, nous avons utilisé une souche cible « *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 » souche de référence de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen.

L'espèce « *Staphylococcus aureus* » est intéressante comme souche cible pour plusieurs raisons : (SIBOUKEUR, 2011)

- elle est sensible aux bactériocines (CHOI, 2000 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010) ;
- elle appartient à la flore de contamination pathogène des produits alimentaires (TRIAS, 2008) ;
- c'est une espèce que l'on peut retrouver dans le lait, mammiteux (LARPENT *et al.*, 1997) ;
- elle est résistante aux antibiotiques (RAHAL, 1984) ;
- elle est catalase positive. Cette propriété permet d'éliminer l'effet inhibiteur du H₂O₂ dans les tests d'antagonisme ;
- c'est une espèce pathogène, responsable de nombreuses affections chez l'Homme et l'animal ;
- sa culture exige un milieu sélectif (milieu hypersalé de Chapman).

2.1.2 Milieux de culture

Gélose nutritive, milieu de De Man –Rogosa et Sharp (MRS), milieu M17, milieu MSE (Mayeux Sandine Elliker), gélose au lait citraté, gélose au sang, gélose à l'esculine, milieu de Naylor et Sharp, milieu de Gravier, milieu KMK (Kempler et Mac Key), milieu Falcau,

milieu Gibson et Abdel Malek, milieu de Chapman, Milieu VRBL et milieu VRBG, bouillon lactosé citraté, bouillon MRS, bouillon M17 et bouillon MSE.

2.1.3 Produits chimiques et réactifs

Bleu de Méthylène, lugol, eau oxygénée à 10 v, NaOH , réactif de Folin-Ciocalteu, phénophtaléine, Sérum Albumine Bovine (BSA), acide acétique, acide sulfurique, sels (acétate de zinc, carbonate de sodium, chlorure de sodium, hexacyanoferrate de potassium, sulfate d'ammonium, sulfate de cuivre, sulfate de potassium, tartrate double de sodium et potassium, solution de diiode , solution de thiosulfate de sodium, empois d'amidon.

2.1.4. Appareillage

pH-mètre (INOLAB, Allemagne), centrifugeuse (SIGMA, Allemagne), spectrophotomètre visible / UV (SCHIMADZU, Japon), densimètres, agitateur magnétique non chauffant de paillasse, bain marie, balance électronique DENVER, étuve (MEMMERT), autoclave (SYSTEC 5075 MLV), compteur de colonies (STUART SC6), four pasteur (HERAEUS), réfrigérateur (CONDOR), congélateur (MIDEA).

2.2 Méthodes d'analyse

La méthodologie de travail adoptée dans cette étude est récapitulée dans la figure 5

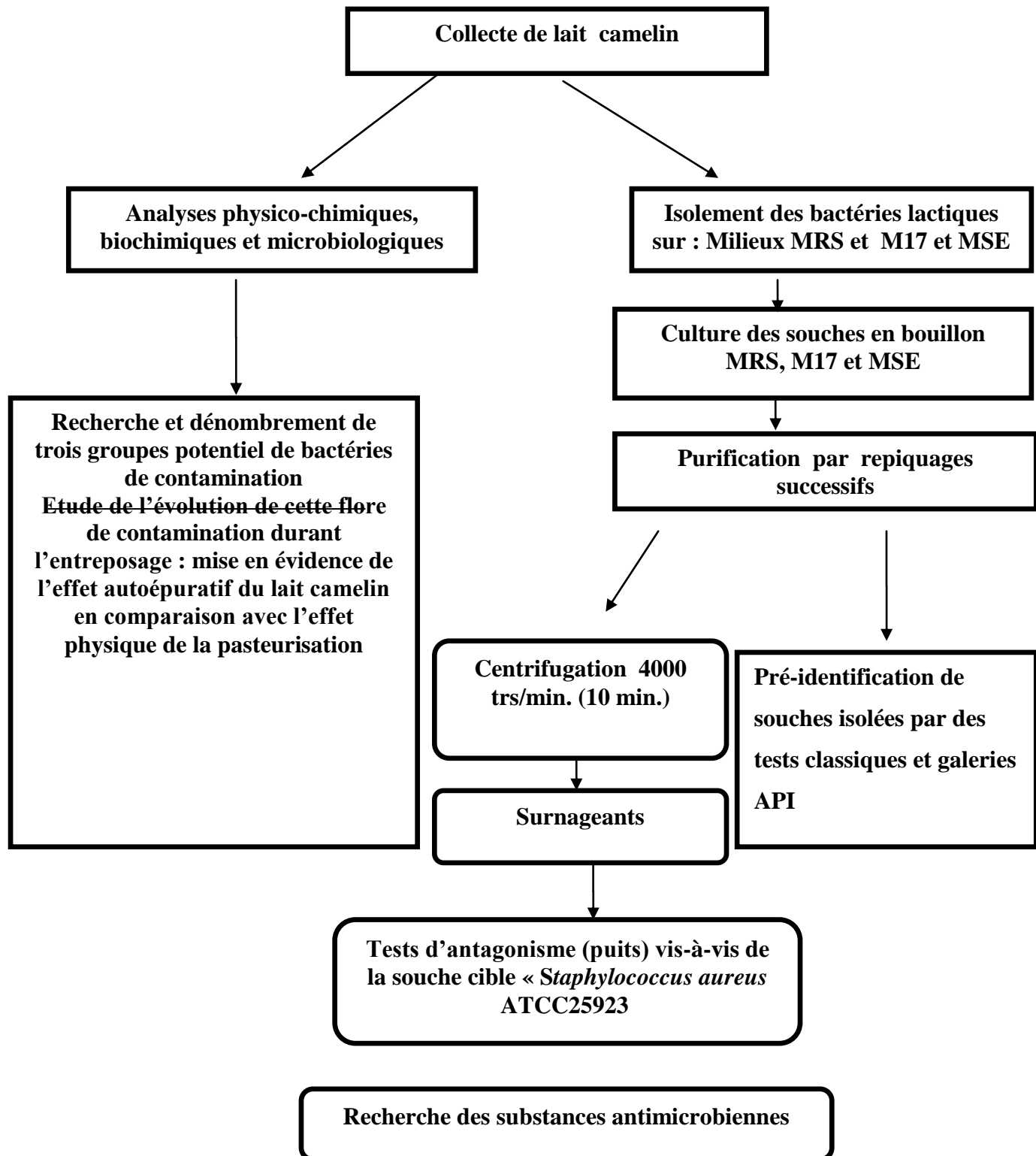


Figure 5 : Procédure expérimentale

2.2.1 Analyses physico-chimiques

Dans cette première partie, le lait a été collecté à partir des chamelles vivant dans les régions d'Ouargla, Taibet et de Touggourt.

Dès son arrivée au laboratoire, des mesures du pH et de l'acidité Dornic sont réalisées. Une partie du lait est soumise à une pasteurisation.

Contrairement à la stérilisation qui se fait à une température de 100 °C et qui a pour but de détruire tous les microorganismes pouvant se développer dans le produit, la pasteurisation se fait à une température inférieure à 100 °C et ne vise à détruire que les bactéries pathogènes présentes sous forme végétative (CAROLE, 2002).

Elle est réalisée dans la présente étude, selon trois couples température/ temps : 63°C/20min, 72°C/15 sec et 85°C/2min (GUIRAUD,2012), par immersion d'un tube capillaire en verre (bord droit et fond rond) contenant 3 ml de lait dans de l'eau maintenue à la température voulue dans un bain-marie. Le contrôle de la température est effectué grâce à un thermomètre plongé dans un tube témoin contenant du lait. A la fin du traitement thermique, les échantillons sont immédiatement refroidis à l'eau du robinet. L'efficacité de la pasteurisation est évaluée par le test de la réductase.

2.2.1.1 Mesure du pH

La valeur du pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications qu'elle donne sur la richesse du lait en certains de ses constituants, sur son état de fraîcheur ou sur sa stabilité (MATHIEU, 1998).

2.2.1.2 Détermination de l'acidité Dornic

L'acidité Dornic est la résultante de l'acidité naturelle du lait (liée à sa richesse en protéines et en minéraux) à laquelle vient s'ajouter l'acidité développée (grâce à l'action des ferments lactiques qui transforment le lactose du lait en acide lactique). C'est un indicateur du degré de conservation du lait. Naturellement le lactose contenu dans le lait se dégrade progressivement en acide lactique par les bactéries. Moins un lait est frais, plus sa teneur en acide lactique est importante.

Selon la méthode Dornic, le titrage se fait à l'aide d'une solution de soude à N/9 (0,111 mole/l) et de phénolphtaléine en solution alcoolique à 2 % employée comme indicateur (NF V04-305, 1985). On prélève 10 ml de lait, on y ajoute deux gouttes de phénolphtaléine et on verse la soude goutte à goutte jusqu'à obtenir une couleur rose pale. La quantité de soude en ml versée multipliée par 10 correspond au degré Dornic. Ainsi 1.8ml de soude versée jusqu'à équivalence correspond à 18°D.

- 1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait

2.2.1.3. Détermination de l'extrait sec

La détermination de l'extrait sec total est réalisée conformément à la méthode normalisée (NF V04.207, 1970). C'est une donnée importante permettant d'évaluer la qualité du lait car elle sert à détecter le mouillage frauduleux du lait.

Dans une capsule préalablement pesée, on introduit 5 ml de lait à l'aide d'une pipette jaugée puis on la place pendant 3 heures dans une étuve réglée à $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Après dessiccation dans un dessiccateur garnie d'anhydride phosphorique ou un autre déshydratant efficace, les capsules refroidies sont pesées, le résultat est exprimée par la formule suivante :

$$\text{MS (\%)} = \frac{\text{G2} - \text{G}}{\text{G1} - \text{G}} \times 100$$

G : Masse de la capsule vide (g)

G1 : Masse de la capsule avec prise d'essai avant étuvage (g)

G2 : Masse de la capsule avec prise d'essai après étuvage (g)

2.2.1.4 Détermination de la densité

La densité nous renseigne sur le taux de matières solides et sur la viscosité de la solution. La densité du lait dépend de tous ses constituants. Elle varie avec le taux butyreux et la teneur en matière sèche dégraissée. Diminuant lorsque le taux butyreux augmente et augmentant en même temps que la teneur en matière séchée dégraissée. La densité permet de soupçonner un mouillage ou un écrémage du lait puisque celui-ci l'augmente et l'addition d'eau a un effet inverse (MATHIEU, 1998).

La mesure de la densité est réalisée à l'aide de lactodensimètres sur le lait maintenu au repos (NF V 04-204, 2004) Le principe consiste à plonger un densimètre dans une éprouvette de 100ml remplie de lait à analyser. Lorsqu'il se stabilise, une lecture directe, nous donne le résultat.

2.2.2. Analyses biochimiques

2.2.2.1 Dosage de la vitamine C

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamine C (SIBOUKEUR ,2007). Deux substances ont une activité vitaminique C : l'acide L-ascorbique et sa forme oxydée l'acide L-dehydroascorbique.

L'acide ascorbique est un agent réducteur très puissant qui s'oxyde très rapidement, surtout à des températures élevées et dans des solutions alcalines. Le dosage de la vitamine C se fait

par titrimétrie à l'aide d'une solution d'iode. Une molécule d'iode réagit avec une molécule de vitamine C selon la réaction suivante :



Lorsqu'il n'y a plus de molécules de vitamine C, les molécules de I_2 s'accumulent dans la solution. Cette accumulation indique la fin du titrage et est mise en évidence par la formation d'un composé bleu de grande intensité. Ce composé est formé par l'iode et l'amidon (Annexe 1).

Expression des résultats :

$$C_{\text{vitc}} = V_2 * C_2 - \frac{1}{2}(V_3 * C_3)$$

D'où :

$C_{\text{vit c}}$: concentration de vitamine c

V_2 : volume de solution de diiode

C_2 : concentration de solution de diiode

V_3 : volume de solution de thiosulfate de sodium

C_3 : concentration de solution de thiosulfate de sodium

2.2.2.2 Dosage de la matière grasse

La matière grasse du lait se compose principalement de glycérides (99%), de phospholipides, de cérébrosides, de cholestérol et d'acides gras libres (CAROLE, 2002). Les lipides sont généralement solubles dans les solvants organiques (éther, chloroforme), mais peu ou non miscible dans les milieux aqueux.

La détermination de la matière grasse est effectuée directement sur le lait par méthode acido-butyrométrique (GERBER) (norme AFNOR : NFV04-210 de décembre 1974).

Les protéines du lait sont dissoutes par l'acide sulfurique, les matières grasses, résistantes à l'action de l'acide sulfurique concentré sont séparées par centrifugation, à chaud en présence d'alcool isoamylique (3-méthyl-1-butanol) qui facilite la séparation. On en mesure le volume vers 65-70°C dans un butyromètre de GERBER.

2.2.2.3 Dosage du lactose

La détermination du lactose est réalisée sur le filtrat après défécation du lait par l'hexacyanoferrate (II) de potassium (NF V 04-213 Janvier 1971). Une solution cupro-alkaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu. Le précipité d'oxyde cuivreux formé est oxydé par une solution de sulfate ferrique et le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie en présence d'orthophénantroline ferreuse comme Indicateur (KONUSPAYEVA, 2007 ; CHETHOUNA, 2011).

2.2.2.4 Dosage des protéines

La teneur en protéines (protéines totales, protéine sériques et caséines) est déterminée par la méthode de LOWRY (1957). Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin, puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm. Le dosage des protéines est réalisé par l'emploi d'un spectrophotomètre visible. La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (CHEVREUX, 2009 ; CHETHOUNA, 2011 ; BOUDJENAH, 2012 ; KASSAS, 2017). La séparation des protéines sérique et caséines s'effectue selon les étapes récapitulées sur la figure 6.

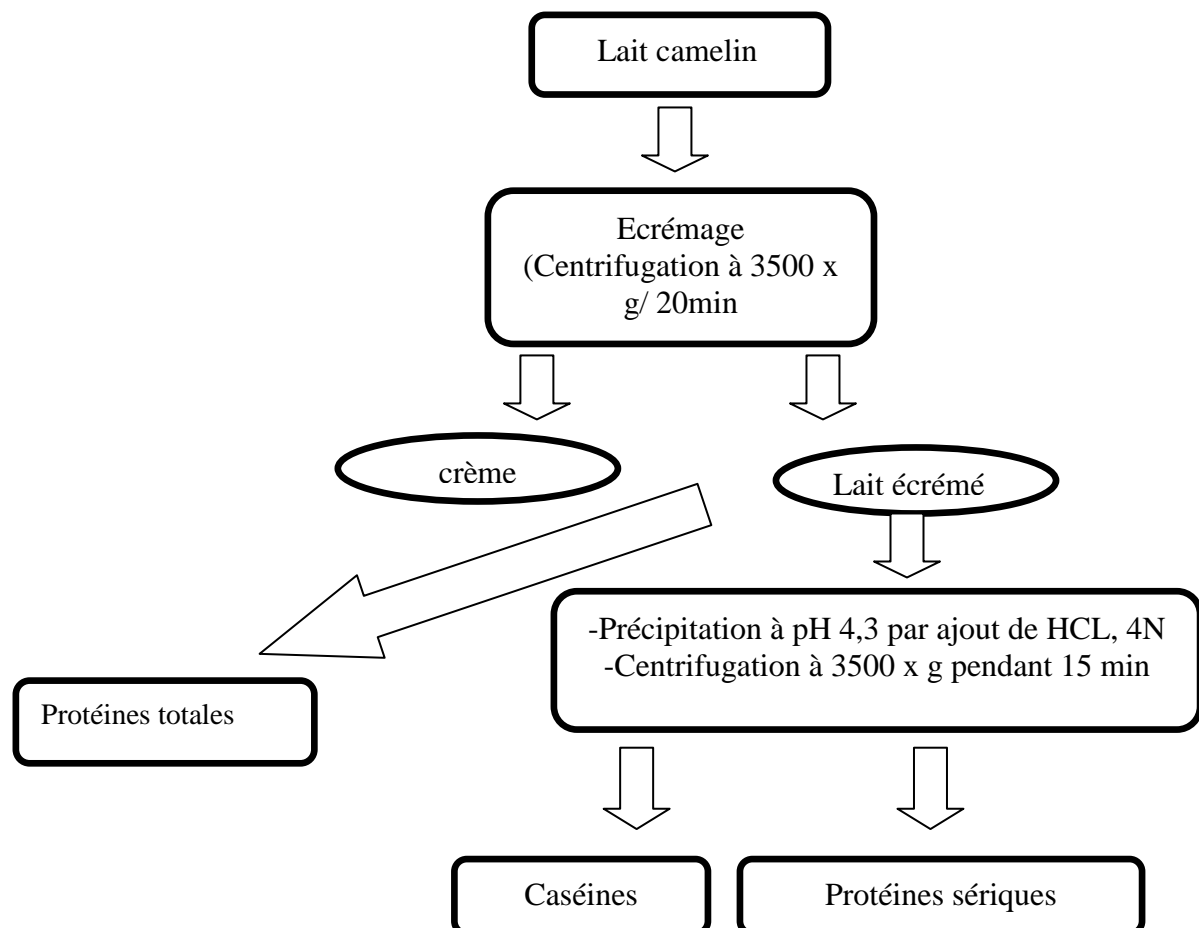


Figure 6: Etapes suivies pour l'isolement des protéines totales, caséines et protéines sériques du lait de chamelle collecté.

L'écémage, est réalisé par centrifugation du lait à 3500 x g / 20 min à 4°C. Le lait est préalablement porté pendant 10 min au bain marie à 30-35°C, en utilisant une agitation douce, afin de permettre la remontée de la matière grasse en surface. La centrifugation à basse température permet ainsi d'avoir une bonne prise en masse de cette matière grasse en surface (SIBOUKEUR, 2007). La séparation entre les caséines et les protéines sériques est obtenue par précipitation du lait à pH 4,3 en présence d'une solution d'acide chlorhydrique, 4N, suivie d'une centrifugation à 3500xg /15 min. Cette opération est répétée deux fois afin d'assurer une meilleure qualité des séparations.

2.2.3 Analyses microbiologiques

Ce volet consiste en l'étude de la qualité microbiologique du lait collecté par le test préliminaire de la réductase, la recherche et le dénombrement des bactéries halotolérantes, des coliformes et des entérobactéries, susceptibles de contaminer le lait camelin et leur évolution durant la fermentation spontanée du lait entreposé à la température ambiante .

2.2.3.1 Test de la réductase

Le test de la réductase permet d'estimer la charge microbienne du lait frais. Son principe est basé sur la décoloration du bleu de méthylène. La rapidité de cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents (LARPENT *et al*, 1997).

2.2.3.2 Etude de la microflore de contamination (microflore exogène)

Nous avons procédé dans cette étude à la recherche et au dénombrement de 3 groupes (les halotolérants, les coliformes et entérobactéries) susceptibles de contaminer le lait du fait des conditions de traite et de la salinité prononcée du lait chamelle.

Les ensemencements sont réalisés en boîtes de pétri, en triple exemplaire. Les dénombrements sont effectués à l'aide d'un compteur de colonies. Seules les boites contenant un nombre convenable c'est-à-dire compris entre 10 et 300 colonies par boite sont prises en compte (GUIRAUD, 1998). Pour cela, nous avons procédé à des dilutions de l'échantillon de lait.

Le tableau VIII résume les conditions de culture utilisées.

Tableau VIII: Milieux nutritifs et conditions de culture de trois groupes de bactéries susceptibles de contaminer le lait camelin.

Groupes bactériens	Milieux de culture	Type d'ensemencement	Température et durée d'incubation	Références
Bactéries halotolérantes	CHAPMAN	En surface	37°C/48H NF V08-057-2	MARCHAL <i>et al.</i> , 1982).
Entérobactéries	VRBG	En masse en double couches	30°C/24 H (NF V 08-054)	GUIRAUD ; 1998
Coliformes	VRBL	En masse en double couches	30°C/24 H (NF V 08-050)	LARPENT, 1997 et GUIRAUD, 1998

2.2.3.2.1 Recherche et dénombrement des germes halotolérants

Les bactéries halotolérantes sont des micro-organismes qui peuvent se reproduire en absence de sel et tolèrent une concentration jusqu'à 15% tel que (les Staphylocoques halotolérants). Elles provoquent par leur production de toxines thermostables, des intoxications de gravité variable. Une fermentation lactique suffisamment active, les inhibe. Mais le risque subsiste s'il ya eu accumulation préalable de toxines en quantité suffisante (FAO, 1992).

Les bactéries halotolérantes se développent sur le milieu hypersalé de Chapman Mannitol Salt Agar (MARCHAL *et al.*, 1982). L'ensemencement se fait en surface par étalement de 0.1 ml d'inoculum. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.2.3.2.2. Recherche et dénombrement des entérobactéries

Les entérobactéries, telles que les salmonelles sont responsables de toxi-infections. Des épidémies de fièvre typhoïde et paratyphoïde ont pour origine la consommation de lait n'ayant pas subi de traitement d'assainissement ou recontaminés. Les colibacilles (*E. coli*) dont certaines souches sont entéropathogènes, peuvent être responsables de graves toxi-infections suite à la consommation de lait ou de produits laitiers infectés (FAO, 1992).

Leur dénombrement s'effectue sur gélose biliée, au cristal violet et au rouge neutre (VRBG), après ensemencement en profondeur et incubation à 30°C, pendant 24 à 48 heures (LARPENT, 1997).

2.2.3.2.3 Recherche et dénombrement des coliformes

Les coliformes sont des micro-organismes d'altération. Leur présence indique une faute hygiénique relevant soit d'une mauvaise qualité du lait utilisé, soit de la malpropreté du matériel de fabrication (LARPENT, 1997). Pour leur dénombrement, le milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est utilisé. L'ensemencement est effectué en profondeur et les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures (LARPENT, 1997).

2.2.3.3 Mise en évidence de l'effet autoépuration du lait camelin durant l'entreposage

Nous avons essayé de comparer l'effet de système auto-épuration naturel du lait camelin décrit par certains auteurs, à celui de la pasteurisation (épuration artificielle) (BARBOUR *et al.*, 1984 ; SIBOUKEUR 2007 ; BOUDJENAH 2012 ; SIBOUKEUR, 2018).

Quatre lots d'échantillons de ce produit ont été constitués. Un lot de lait cru et trois autres soumis chacun à la pasteurisation, basse (63°C/20min.), haute (85°C/2min.) et HTST (72°C/15 sec.). Les produits ont été entreposés à la température ambiante (25°C environ) (fermentation spontanée).

Des lots témoins ayant subi les mêmes traitements ont été stockés à 4°C.

Les lots réfrigérés et les lots pasteurisés sont considérés comme des contrôles positifs respectivement bactériostatiques et bactéricides.

2.2.3.3.1 Evolution du pH et de l'acidité Dornic durant l'entreposage

L'évolution du pH et de l'acidité Dornic des lots expérimentaux de lait durant son entreposage à la température ambiante (fermentation spontanée) et à 4°C, a fait l'objet d'un suivi.

2.2.3.3.2. Evolution de la flore de contamination

Un suivi de l'évolution de trois groupes de bactéries susceptibles de contaminer le lait camelin recherché et dénombrés précédemment est réalisé durant la période d'entreposage à la température ambiante et à 4 °C des échantillons crus et ceux pasteurisés.

Des ensemencements ont été réalisés en triple exemplaire, en boîtes de pétri. Les dénombrements ont été effectués à l'aide d'un compteur de colonies

2.2.3.4 Recherche des substances à activité antibactérienne

L'objectif assigné à cette partie du travail vise à étudier dans un premier temps l'activité antibactérienne de quelques souches de la flore banale (les lactobacilles, les lactocoques et les leuconostocs) isolées à partir du lait camelin, contre de la souche cible « *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ». Dans un second temps, l'étude vise la recherche de quelques substances responsables de cette activité antibactérienne. Les échantillons de lait analysés dans cette partie de travail, proviennent de la région de Touggourt. Ils ont été collectés durant

le mois d'avril. Les prélèvements ont été réalisés dans de bonnes conditions puis aussitôt transportés au laboratoire pour y subir les analyses microbiologiques prévues

2.2.3.4.1 Isolement et culture des souches lactiques indigènes

Deux tubes à essai sont remplis de lait. Le premier est incubé à 30°C et le deuxième à 45°C, jusqu'à obtention d'un coagulum sous l'effet de l'acidification due à la flore lactique indigène, mésophile ou thermophile (KARAM, 2006). Dès coagulation, le coagulum est homogénéisé. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}) de la suspension mère sont alors réalisées à l'aide de l'eau peptonée stérile (Annexe 2), puis 1 ml de chaque dilution est ensemencé sur un milieu gélosé spécifique (tableau IX).

Tableau IX : Milieux d'isolement et conditions de culture des souches lactiques

Milieux d'isolement	Bactéries	Incubation	ensemencement	Références
MRS (Man <i>et al.</i>, 1960) + vert de bromocrésol	Lactobacilles	37°C/24-72h	Anaérobiose en profondeur	ALLOUCHE, 2010 GUIRAUD, 2012
M17 (Terzaghi et sandine, 1975)	Lactocoques	37°C/48h	Aérobiose en surface	GUIRAUD, 2012 BEKHOUCHE, 2006
MSE (Mayeux <i>et al.</i>, 1962)	Leuconostocs	21°C/4jours	Aérobiose en surface	GUIRAUD, 2012

- ❖ L'ajout du vert de bromocrésol au milieu MRS permet une meilleure différenciation des bactéries lactiques qui donnent des colonies acidifiantes entourées d'un halo jaune alors que les contaminants donnent des colonies faiblement acidifiantes avec halo bleu.

2.2.3.4.2 Purification des souches

Des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse sont récupérées et les tests préliminaires comprenant la coloration de GRAM et le test de catalase sont réalisés. Seules les souches à GRAM positif, catalase négative et non sporulées sont retenues et repiquées sur les bouillons MRS et M17, MSE. L'opération est renouvelée (4 repiquages successifs) jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par des observations microscopiques.

2.2.3.4.3 Conservation des isolats

Les souches retenues sont alors soumises à deux types de conservation qui diffèrent par leur durée :

***Conservation à court terme**

La conservation des souches est effectuée sur milieux MRS et M17, MSE solides inclinés après incubation à des températures convenables pour chaque genre pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C. La culture est renouvelée tous les 15 jours (SAIDI *et al.*, 2002).

***Conservation à long terme**

A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé à 0.2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorf à -20°C. Des travaux indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation (MAMI, 2014). Au moment de leur utilisation, les cultures sont décongelées et repiquées dans le lait écrémé à 0.5% d'extrait de levure. (SAIDI *et al.*, 2002, GUESSAS et KIHAL 2004 ; MERZOUK,2015).

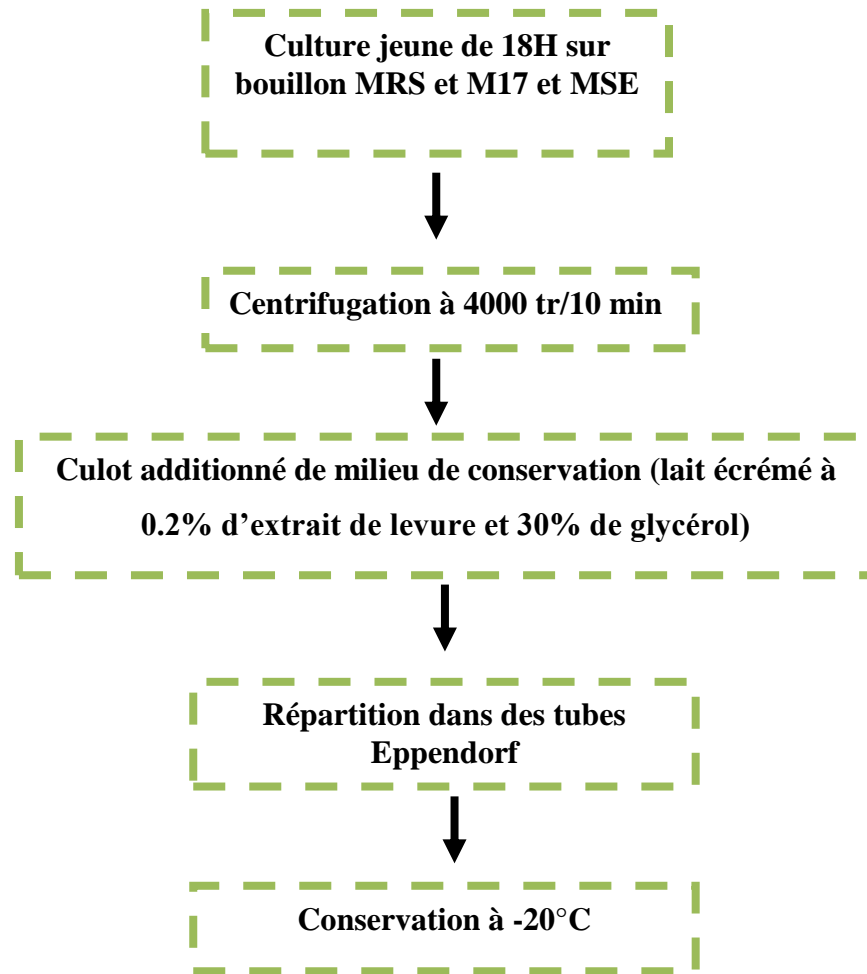


Figure 7 : Conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées

2.2.3.4.4. Pré-Identification des bactéries lactiques isolées

Une pré-identification des souches est réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (KANDLER et WEISS, 1986; STILES et HOLZAPFEL, 1997 et CARR *et al.*, 2002, GUIRAUD, 2012,). L'utilisation des galeries API 50 CH et API 20 STRP est effectuée pour compléter cette partie du travail.

a/Tests phénotypiques

a₁/Observation macroscopique

Cette observation consiste en la description détaillée de l'aspect des colonies développées sur des milieux solides à savoir leur taille, leur forme, leur couleur, leur consistance ...etc.

Globalement les colonies qui nous intéressent doivent répondre aux critères morphologiques suivants :

- transparentes, de diamètre compris entre 0.5 et 1 mm, gluants et visqueux, à contour régulier en ce qui concerne les leuconostokes ;
- de petites tailles, blanchâtres, laiteuses, lisses et régulières, en ce qui concerne les lactocoques et les lactobacilles.

a₂/Observation microscopique

Les observations microscopiques effectuées à l'objectif 100 avec immersion, permettent d'examiner des prélèvements de colonies à l'état frais et après coloration de GRAM.

L'examen à l'état frais permet de différencier les bactéries d'après leur forme (cocci ou bâtonnet) et leur mode d'association.

La coloration de GRAM est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries, non seulement d'après leur forme mais aussi d'après leur affinité pour les colorants, liée à la structure générale de la paroi (MARCHAL *et al.*, 1982), dont les bactéries à Gram+ coloré en violet et Gram- en rose

b/Tests physiologiques et biochimiques

b₁/Recherche de la catalase

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

b₂/Tests de croissance sur des milieux hostiles

Ces tests sont réalisés pour la différenciation entre des *Lactococcus* et des *Enterococcus* (SCHLEIFER *et al.*, 1985 ; STILES et HOLZAPFEL, 1997 ; GUIRAUD, 2012) et la caractérisation des *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (CARR *et al.*, 2002)

*** Test de croissance en milieux hypersalés**

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de Sodium (NaCl), donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons MRS (pour les *Lactobacillus*) et Naylor et Sharpe (pour les *Lactococcus*) hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48 h l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (GUIRAUD, 2012),

***Test de croissance sur milieux à pH=9.6 et à pH= 3.9 :**

Ce test est réalisé sur bouillon Naylor et Sharpe ajusté à un pH = 9.6, et sur bouillon MRS ajusté à un pH=3.9. Après une incubation à 30°C pour les souches mésophiles et à 45°C pour les souches thermophiles pendant 24h à 48 h l'observation d'un trouble signifie que la bactérie résiste au milieu hypoalcalin (pH=3.9) ou hyperalcalin (pH = 9.6) (MAGHNIA, 2011).

***Test de croissance à différentes températures et la thermorésistance**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Nous avons étudié aussi la thermorésistance.

➤ Pour les *Lactobacilles* :

Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, des tubes sont incubés pendant 24h à 48h à température 45°C et d'autre tube incubé durant 1 à 2 semaines à 15°C.

Pour la thermorésistance deux tests sont réalisés : l'un à 60 °C durant 90 min, l'autre à 65 °C durant 30 min (GUIRAUD, 2012)

➤ Pour les *streptococcus et lactococcus et les Enterococcus*

En ensemençant deux tubes de milieu liquide (bouillon de Naylor et Sharpe) (composition voir annexe 2) par culture pure est incubés à 45°C durant 24 à 48 heures et à 10° C durant 7 à 10 jours. En utilisant le même milieu pour étudier la thermorésistance, par chauffage du milieu à 60-63°C pendant 30min.

➤ Pour les *Leuconostoc*

La culture à 37°C et la résistance pendant 15 minutes à 55°C sont mise en évidence par culture sur le milieu décrit par GARVIE (1986) (Annexe 2)

***Culture sur lait de Sherman :**

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3% (1 ml de solution à 1% et 3% dans 9ml de lait). Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les *lactococcus* réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant (GUIRAUD, 2012 ; IDOUI et KARAM., 2008).

*** Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :**

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citrulline à partir de l'arginine (GUSILS *et al.* 2010). Pour réaliser ce test, le bouillon Falkow à arginine et bouillon Falkow sans arginine

(témoin) sontensemencés par les cultures à tester (GUIRAUD 2012). Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose, puis un virage vers le violet (après 24H) qui est dû à la formation d'ammoniaque, le tube témoin vire au jaune et garde la couleur.

***Production d'acétoïne**

Pour réaliser ce test, le bouillon Clark et Lubs (ANNEXE 2) est réparti dans des tubes à essai stérilisés. Chaque tube estensemencé par la culture à tester. Après une incubation pendant 24 h, le test basé sur la réaction de Voges-Proskauer est alors pratiqué. Pour ce faire, Cinq gouttes d'une solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée (VP1) et 5 gouttes de réactif α -naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP2) y sont ajoutées. On agite soigneusement les tubes et on laisse au repos 5 à 10 min. à la température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose (BEKHOUCHE, 2006 ; IDOUI et KARAM., 2008)

***Utilisation du citrate :**

L'utilisation du citrate est étudiée par l'ensemencement sur milieu Kempler et McKay (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique (DRICI, 2010). La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanure de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation a 30°C). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

***Recherche de la citratase :**

Cette enzyme est mise en évidence par culture sur gélose semi- solide, au lait citraté. La gélose estensemencée en masse et incubée à 30°C pendant 2 à 7jours. La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu. C'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et en acétoïne (ANNEXE 4) (DAOUDI, 2006).

***Recherche du type fermentaire :**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié estensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de gélose blanche stérile est coulé en surface. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 2 à 7 jours (GUIRAUD, 2012). Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le

milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de cette gélose vers le haut du tube.

***Test d'hémolyse**

Le caractère hémolytique est recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval (gélose fondu plus 5% sang) après incubation pendant une période de 24h à 48h à 37°C puis pendant 24 h à 4°C, le type d'hémolyse est examiné.

Les streptocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies), β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié) (LARPENT, 1997 ; JAMALY *et al.*, 2011 ; GUIRAUD, 2012 ; LAMARI, 2014)

***Production de dextrane**

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux *et al.*, 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes.

***Test hydrolyse de la gélatine**

Elle est testée par une culture sur milieu à la gélatine en culot (ensemencée par piqure centrale). Le tube est observé après un délai de 48 heures à 2 semaines à température ambiante, la liquéfaction de la gélatine traduit son hydrolyse (GUIRAUD, 2012; DAOUDI, 2006).

***Test d'hydrolyse de l'esculine :**

Avec une culture bactérienne de 24 H, nous avons ensemencé sur milieu gélose esculine et incubé à 37°C pendant 24H à 48H. L'hydrolyse de l'esculine se traduit par noircissement du milieu (LARPENT, 1997 ; GUIRAUD, 2012) (ANNEXE 2).

***Test d'hydrolyse de l'amidon :**

Elle est testée par une culture sur milieu gélose nutritive ordinaire additionné de 0.3% d'amidon soluble en boîte de pétri. Après 3 jours de culture, l'hydrolyse est caractérisée au lugol. L'apparition d'une zone claire autour de la culture indique que l'amidon a été dégradé, la bactérie possède donc l'amylase. L'apparition d'une coloration bleue autour de la culture indique que l'amidon n'a pas été dégradé, la bactérie ne possède donc pas d'amylase (BEKHOUCHE et BOULEHROUF, 2005).

*** Fermentation des sucres :**

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter quelques sucres. Les suspensions bactériennes sont obtenues à partir des cultures sur milieux MRS, M17, MSE qui sont incubé à 30°C pendant 18 H, 2 ml de la culture jeune sont centrifugé à 5000t/min.

pendant 5 min. Les culots contenant les cellules bactériennes sont ensuite lavés deux fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les traces du milieu de culture. Ensuite, 2 ml de MRS BCP (milieu MRS sans sucre avec indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol) pour les lactobacilles et 2 ml d'eau peptonée à 0.5% contenant du bleu de bromothymol pour les lactocoques sont ajoutés au culot ce qui représente l'inoculum, on rajoute du sucre à la concentration finale de 0.5%. Une couche suffisante de l'huile de paraffine stérile est versée à la surface du milieu pour favoriser l'anaérobiose. Après 3 à 7 jours d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre testé. Pour chaque milieu utilisé, un témoin sans sucre ensemencé par les souches est utilisé. Ce test a été réalisé sur 10 sucres qui sont : le lactose, le saccharose, le fructose, le maltose, le mannitol, le raffinose et la rhamnose, xylose, arabinose, ribose.

***Profil fermentaire sur galerie**

Ces tests sont vérifiés par l'établissement des profils fermentaires des souches retenues par le biais des galeries biochimiques API 50CH (ANNEXE 5). Nous avons utilisé, en parallèle, des galeries API 20 STRP (ANNEXE 6) pour la mise en évidence de quelques activités enzymatiques ou de fermentation des sucres, Ce type de micro-test permet de faire un diagnostic de groupes ou d'espèces pour la plupart des streptocoques, entérocoques. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

L'identification est obtenue à l'aide du « Catalogue Analytique » ou d'un logiciel d'identification.

2.2.3.4.5. Mise en évidence des inhibitions entre surnageant et souche cible

La recherche des substances inhibitrices potentielles produites par les bactéries lactiques isolées est réalisée sur les surnageants de culture tel que de nombreux auteurs le rapportent (ACHEMCHAM et ABRINI, 1997 ; LABIOUI *et al.*, 2005; SIBOUKEUR ; 2013 ; KHODJA, 2018).

Les tests d'antagonisme vis-à-vis de la souche pathogène référencée « *Staphylococcus aureus* 25923ATCC », est effectuée selon les trois méthodes classiques : spots, puits et disques.

➤ Méthode des disques

Un volume 20 ml du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de pétri stériles de 90mm de diamètre. Après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la suspension de la souche cible. Cinq disques stérilisés (de 6mm de diamètre) de papier

filtre préalablement imprégnés de surnageant de culture des souches à tester y sont déposés (BARBOUR *et al.*, 1984 ; SIBOUKEUR, 2011).

Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 4000 tours / min pendant 10 min (2683 g) d'une culture de la souche test (cultures sur bouillons, M17, MRS et MSE). Pour une meilleure diffusion de la substance antibactérienne potentielle, dans le milieu gélosé, les boîtes sont placées à 4 °C pendant 2 à 4 heures. On incube à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques.

➤ **Méthode des spots**

Après avoir coulé les boîtes de pétri de 90mm avec le milieu de culture (solidifié et séché) on dépose 5µl de surnageant en spots. Les boîtes sont séchées à l'air ambiant près du bec bunsen pendant environ 30 minutes, La gélose est recouverte d'une gélose semi -molle du milieu Mueller-Hinton ensemencé avec 100µl de la souche cible (*Staphylococcus aureus* 25923 ATCC). Les boîtes sont incubées 24 heures à 37 °C. L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition des zones claires autour des puits (FLEMING *et al.*, 1975 ; SCHILLINGER et LUCKE, 1989)

➤ **Méthode des puits**

Vingt millilitres de milieu gélosé, sont recouverts avec 5 ml de milieu semi-solide (0,7 % d'agar) préalablement ensemencé avec 0,05 ml de la suspension de la souche cible (dilution 10^{-1}). Sur les boîtes de pétri inoculées préalablement, par la culture cible, on réalise des puits de 6 mm de diamètre. Ces derniers sont par la suite, remplis par surnageant de la culture test. Les boîtes de pétri ainsi préparées sont pré-incubées pendant 2 à 4 heures à + 4 °C, afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur, puis suivies par une incubation à 37 °C durant 18 à 24 heures (DOUMANDJI, 2008 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; KHAY *et al.*, 2011)

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. La lecture se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm. La mesure du diamètre d'inhibition Z_i est effectuée selon la formule suivante

$$Z_i \text{ en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6mm)}$$

2.2.3.5. Optimisation des conditions de production des substances antibactériennes

Dans un but d'essai d'augmentation de la production des substances antibactériennes, nous avons dans un premier temps procédé à la propagation des souches retenues. La seconde étape a consisté en l'optimisation du pH et de la température du milieu de culture des souches d'intérêt douées d'une activité antibactérienne.

2.2.3.5.1. Propagation des souches

Cette étape consiste à ensemencer une colonie de bactéries lactiques préalablement purifiée (inoculum) dans 1 ml de bouillon approprié (M17, MRS et MSE) puis à incuber à la température convenable : on obtient alors la «culture intermédiaire1» puis on procède à un deuxième repiquage qui consiste à inoculer 1 ml de la culture intermédiaire 1 dans un tube contenant 9 ml de milieu (M17 MRS et MSE) : on obtient la «culture intermédiaire 2».(DOUMANDJI, 2008 ; SIBOUKEUR, 2011).

Après incubation à 37°C/18 à 24heures, le tube contenant la culture intermédiaire 2 est utilisé pour l'ensemencement de 90 ml de milieu.

Les cultures ainsi obtenues sont centrifugées à 4000 tours / min. pendant 10 min. Le surnageant est utilisé pour la mise en évidence des inhibitions (Figure 8).

2.2.3.5.2. Optimisation de la température

Les souches sont ensemencées dans les bouillons, MSE, MRS et M17 et incubées à 30°C, à 37°C et à 45°C pendant 24 h, puis en procède à la centrifugation (4000 tours/ min pendant 10 min) (2683g). L'activité antibactérienne est évaluée sur le surnageant par la méthode des puits après incubation 24 h/37°C.

2.2.3.5.3. Optimisation du pH

Les souches sont ensemencées dans les bouillons, MSE, MRS et M17 dont le pH est ramené à 3, 4, 5, 6 et 7 à l'aide des solutions de NaOH 1N et HCl 1N. On effectue ensuite une centrifugation comme précédemment. L'activité antibactérienne est évaluée sur le surnageant par la méthode des puits après incubation 24 h/37°C.

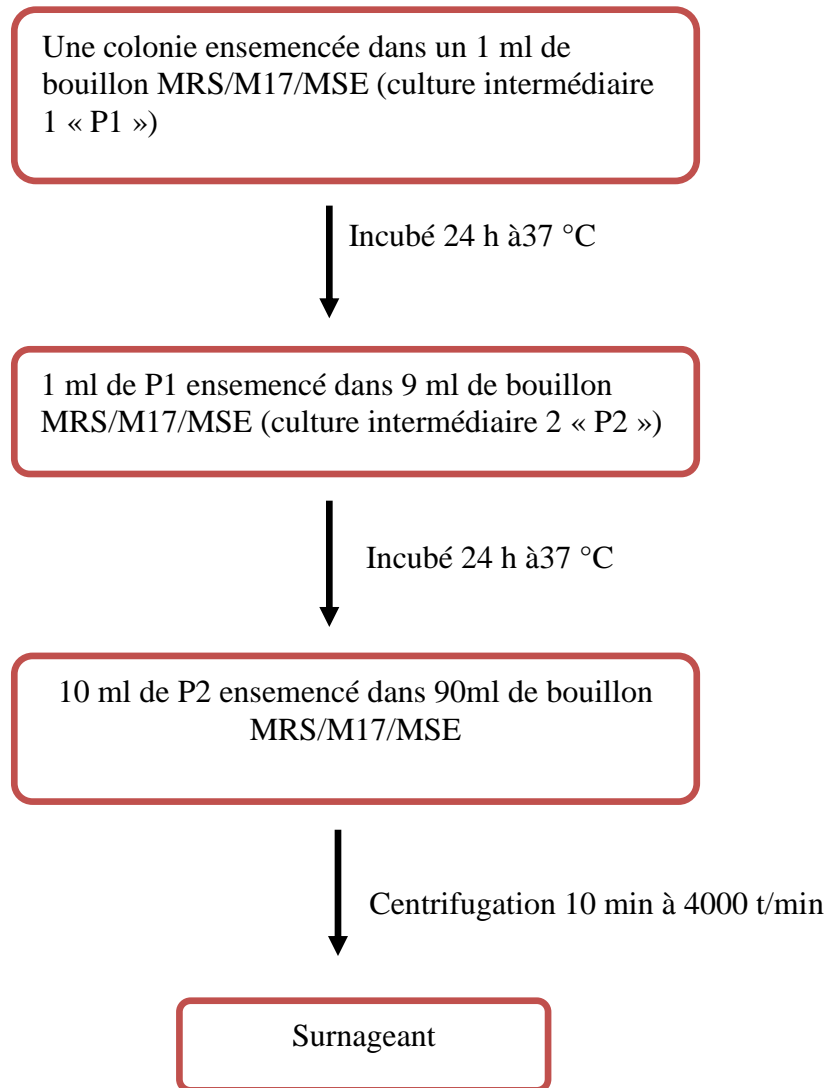


Figure 8 : Schéma simplifié des étapes de la propagation de la souche

2.2.3.6 Mise en évidence la nature de l'agent anti-bactérien

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis de la flore de contamination, peut être attribuée à plusieurs substances tels que les acides organiques (l'acide lactique, acétique,...etc.), le CO₂, la reutérine, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (RODRIGUEZ *et al.*,2002 ; MALDONADO *et al.*,2003 ; TODOROV et DICKS,2005 ; BOUMHIRA *et al.*, 2011).

Dans le but de déterminer la nature des agents anti-bactériens produits par les souches autochtones (flore indigène) isolées à partir du lait camelin ayant fait l'objet de la présente étude, nous avons adopté la méthode expérimentale résumée dans la figure 9.

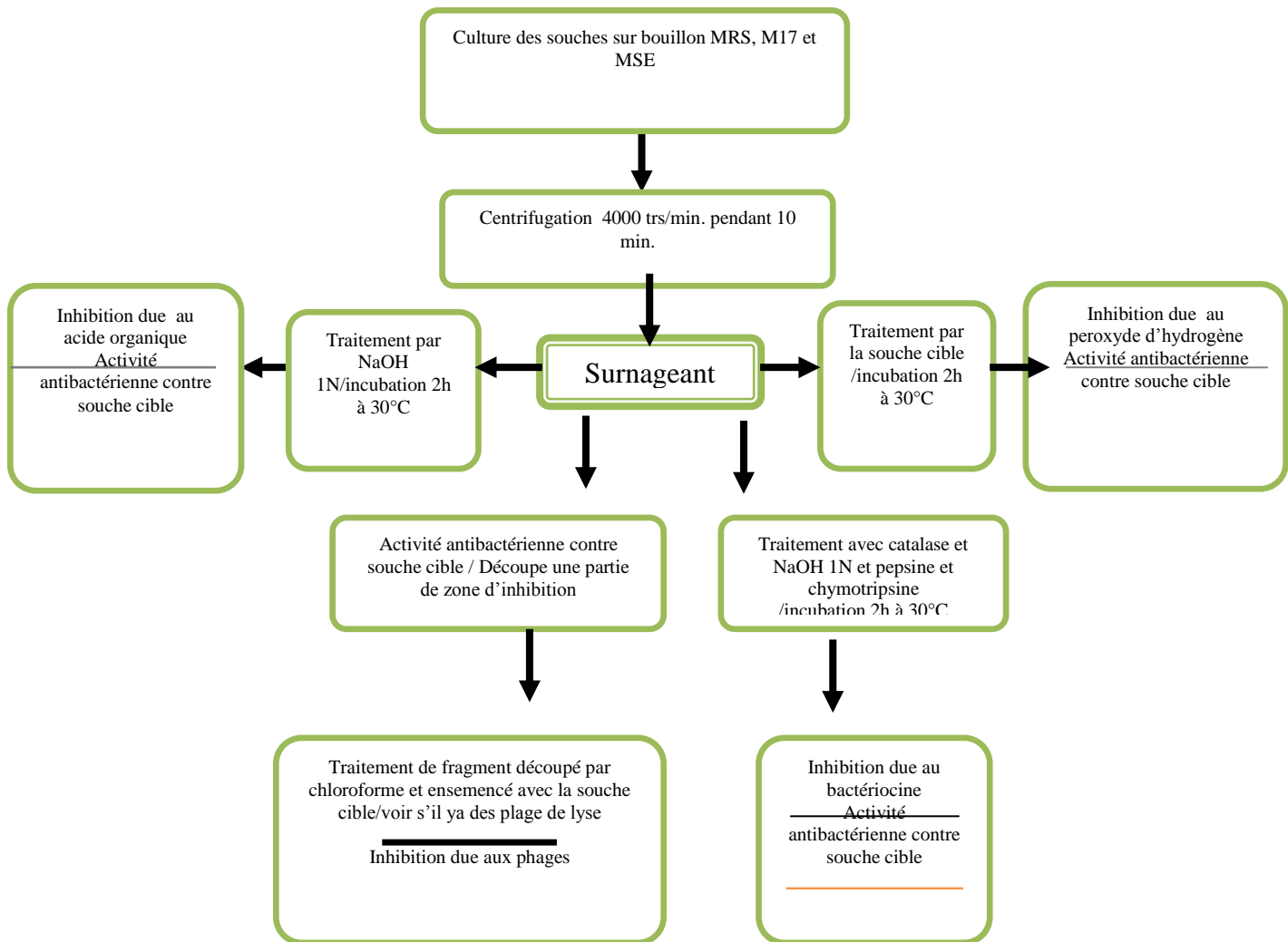


Figure 9: Mise en évidence de la nature de l'agent anti-bactérien

2.2.3.6.1. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Pour détecter la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les surnageants de culture des souches lactiques sélectionnées doivent être traités par 1mg/ml de catalase (LABIOUI *et al.*, 2005 ; MERZOUK, 2015). Dans la présente étude, l'utilisation d'une souche cible catalase + nous a permis de lever l'inhibition susceptible d'être exercée par le peroxyde d'hydrogène (MAMI *et al.*, 2010 ; SIBOUKEUR, 2011 ; BOURICHA, 2011). L'activité antibactérienne est déterminée pour chaque souche après incubation de 18 à 24 heures, à 37 °C des boîtes de Pétri dans une jarre d'anaérobiose afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la production de peroxyde d'hydrogène (ALLOUCHE *et al.*, 2010).

En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits, pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis du germe cible testé.

2.2.3.6.2. Inhibition due aux acides organiques

Le surnageant de culture des souches testées (lactobacilles, lactocoques et les leuconostocs) est ajusté à pH neutre 6,5 à 7 avec NaOH de 1N. Cette neutralisation permet d'éliminer l'effet des acides organiques. L'activité antibactérienne est alors déterminée pour chacune des souches par la méthode retenue des tests d'antagonisme (LABIOUI *et al.*, 2005 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; TABAK et BENSOLTANE, 2012).

2.2.3.6.3. Inhibition due aux phages

Le but de ce test est de détecter des inhibitions provoquées par une éventuelle présence de phages. Pour ce faire, des fragments de gélose sont prélevés à partir des zones d'inhibition. Le fragment découpé avec une pipette pasteur est suspendu dans 1 ml de tampon phosphate stérile contenant 50 µl de chloroforme (Iso 10705-1 (2001)). Après agitation, on laisse décanter 5 min, puis on prélève 300µl de milieu que l'on ajoute à 7.5 ml de gélose molle contenant la souche indicatrice à 0.1 ml. Le mélange est coulé dans une boîte de pétri et incubé 48h à 28°C, la présence de plage de lyse indique la présence de phage (HANNACHI, 2008 ; MAMI, 2013)

2.2.3.6.4. Inhibition due aux bactériocines

Pour réaliser cette partie, nous avons levé l'inhibition éventuelle du peroxyde d'hydrogène par ajout de quelques gouttes de catalase. La possibilité de l'inhibition par les acides organiques est levée par neutralisation du milieu (ajustement du pH à 6.5) (LABIOUI *et al.*, 2005).

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique (KLAENHAMMER, 1988 ; LE LAY, 2009) sensibles aux enzymes protéolytiques et thermostables (ENNAHAR *et al.*, 2000, GALVEZ *et al.*, 2007 ; MECHAI, 2009). Ces caractéristiques sont mises à profit pour vérifier la nature de la substance active contenue dans le surnageant de culture des souches lactiques autochtones du lait ayant fait l'objet de la présente étude.

Pour s'assurer de la nature protéique des substances inhibitrices, on utilise des enzymes protéolytiques : la trypsine et la chymotrypsine. Chaque enzyme est dissoute dans du tampon phosphate de 0.1 mole/l ajusté à pH 7,0 avec du HCl ou du NaOH 1 mole/l (ANNEXE 02). Le surnageant doté d'une activité inhibitrice est additionné à ces enzymes et incubé à 37°C pendant 2 heures et demie. Le surnageant est stérilisé par filtration (0.45 µm de diamètre). Les surnageants ainsi traités subissent des tests d'antagonisme et sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures (LACHANCE, 2000 ; HANNACHI, 2008 ; DOUMANDJI *et al.*, 2010 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010).

2.2.3.6.4.1 Caractérisation de la substance antibactérienne (bactériocine) contenue dans le surnageant de culture

Dans le but de caractériser la substance antibactérienne (bactériocine) et de déterminer sa nature chimique, nous avons utilisé des surnageants dont le pH a été neutralisé (pH=6.5) et traité avec la catalase (pour éliminer les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène).

a/ Effet de la température

Les surnageants neutralisés et traité avec la catalase de culture des souches étudiées subissent des traitements thermiques à 70°C, 80°C et 90°C pendant 10 minutes et une série d'autoclavage à 100 °C et 121 °C durant 30 et 15 min respectivement, suivis d'un refroidissement immédiat à 4°C. Des tests d'antagonismes par la méthode de diffusion (puits) après incubation à 37°C pendant 24 heures sont ensuite appliqués (LACHANCE 2000 ; LABIOUI *et al.*, 2005 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; KHAY *et al.*, 2011 ; MERZOUK, 2015)

b/ Effet de la pH

Le surnageant de chaque culture de souche a été ajusté aux niveaux de pH allant de 2 à 10 avec HCl 1 N et NaOH 1 N. Après incubation à 37 °C pendant 5 h (KHAY *et al.*, 2011), le pH a été réajusté à 6,5 (pour éliminer l'effet des acides organiques) avant l'évaluation d'activité antibactérienne, incubation à 37°C pendant 24 heures (DENIS, 2001 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010)

2.2.3.6 Suivi de la cinétique de croissance des souches test

Dans le but de déterminer la souche la plus performante, nous nous sommes proposé d'étudier la cinétique de croissance des souches lactiques isolées par la mesure de la densité optique à 600nm toutes les 3heures (ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; KHODJA, 2018).

Des milieux MRS et M17 sontensemencés par des précultures à raison de 1% (figure 10). Les cultures obtenus sont répartis dans des tubes à hémolyse en verre de 5 ml (10 tubes pour chaque souche) et incubé à 37°C pendant 48h. La lecture de la densité optique est effectuée pour chaque tube de culture contre le blanc adéquat (MRS ou M17 nonensemencé par les souches lactiques) (DOUMADJI, 2008 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; LEKSIR, 2013 ; KASSAS, 2017 ; KHODJA, 2018)

2.2.3.6.1 Effet de substance antibactérienne sur la croissance de *staphylococcus*

Afin d'étudier l'activité de la substance antibactérienne produite par les souches lactiques isolée vis-à-vis de la souche pathogène *Staphylococcus*, des cultures de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 sont inoculées dans un bouillon nutritif (ANNEXE 02), incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. La densité optique est mesurée toutes les trois heures.

Un volume de 1ml de surnagent neutralisé et non neutralisé de souche lactique (Lb11, Lc3, Lc5, Lc6, Ln5, En22) est ajouté à la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 après la 4^{ème} heures d'incubation (figure 10). Des prélèvements stériles sont effectués à des intervalles de temps réguliers afin d'évaluer la production de la biomasse bactérienne, mesurée à une longueur d'onde de 600nm (BHUNIA *et al.*, 1991 ; RODRIGUEZ *et al.*,2000 ; KHODJA, 2018).

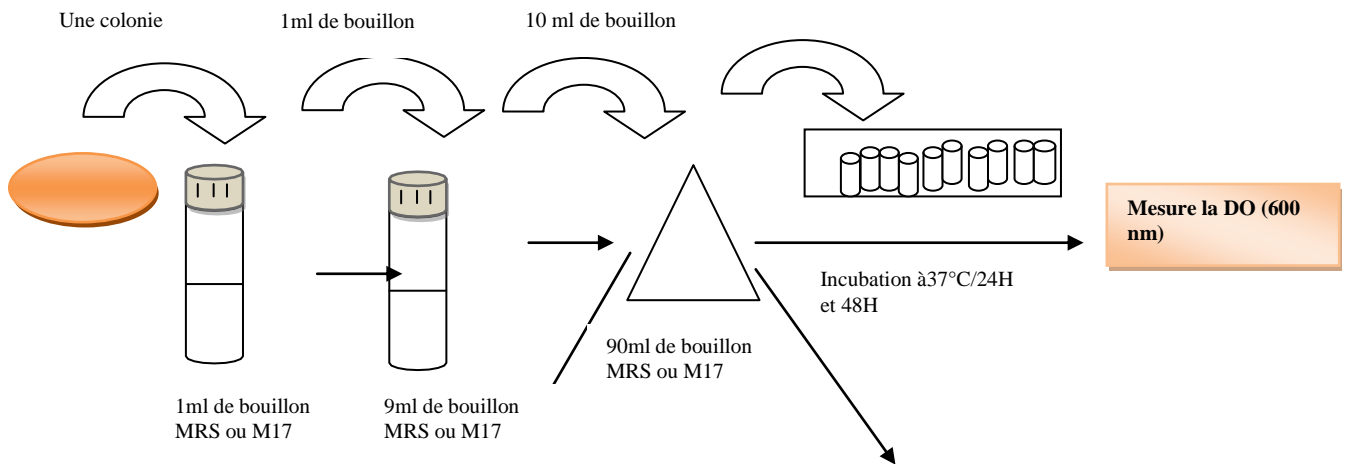
2.2.3.6.2 Analyse statistique

Dans le but de comparer l'effet des substances antibactérienne sur la souche cible, nous avons utilisé le logiciel XLSTAT, le test χ^2 ou Chi- deux.

- Le chi carré est un test statistique conçu pour déterminer si la différence entre deux distributions de fréquences est suffisamment grande pour être statistiquement significative.

Si la différence entre les deux distributions est réduite, l'hypothèse nulle sera acceptée. Si la différence est grande, l'hypothèse nulle sera rejetée. Dans ce dernier cas, on parlera d'une différence statistiquement significative parce que l'écart entre les deux distributions est trop important pour être expliqué par le hasard seulement : une différence réelle existe donc.

A/



B/

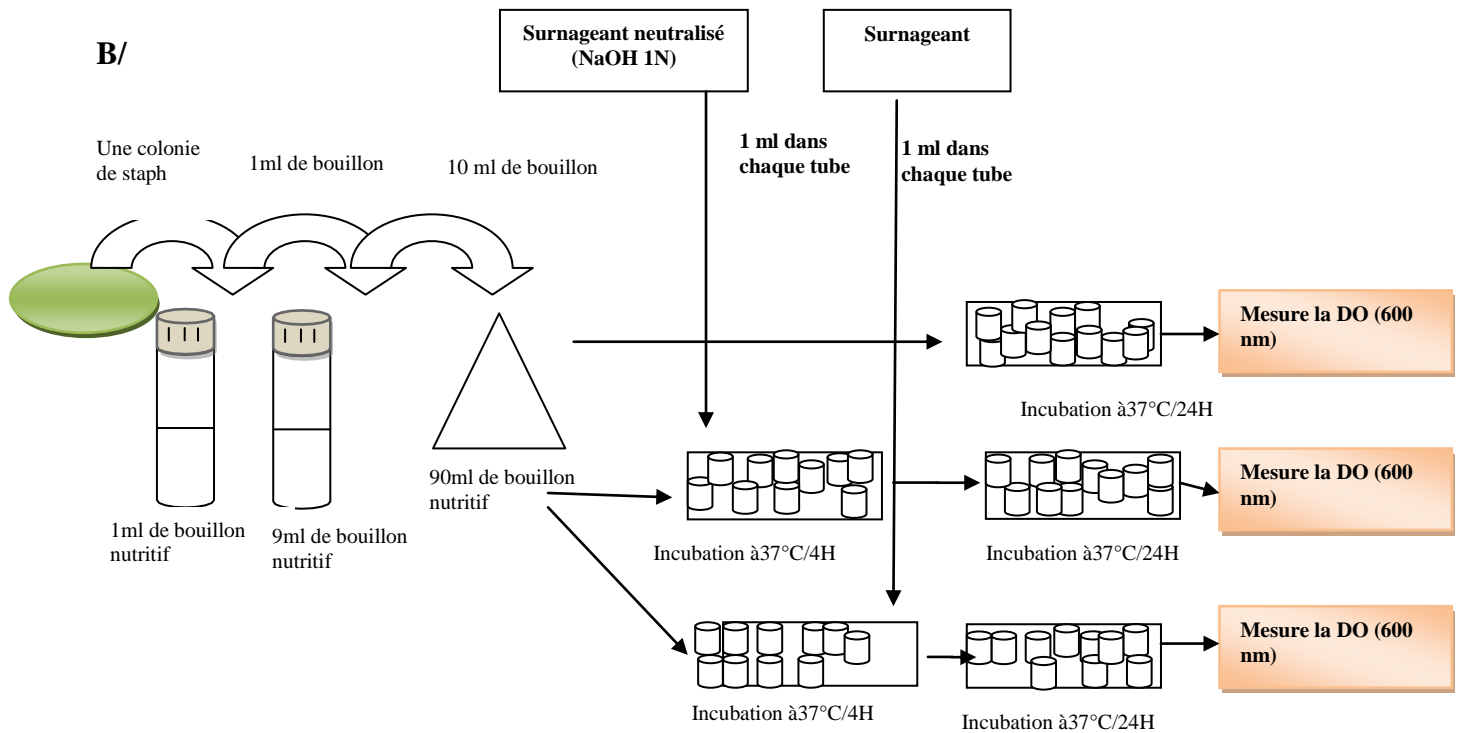


Figure 10 : Schémas montre (A) Cinétique de croissance des souches lactiques isolées et (B) Effet de substance antibactérienne sur la croissance de *staphylococcus*

Chapitre III :

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1 Caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et biochimiques du lait collecté

Les échantillons collectés lors de la présente étude, ont un goût particulièrement salé. Ceci est dû à la nature des plantes halophiles caractérisant les parcours sahariens.

Le tableau X regroupe les résultats relatifs aux caractéristiques physico-chimiques et biochimiques de lait collecté. Les résultats sont la moyenne de 7 échantillons de lait de dromadaires appartenant à la population'' Sahraoui''.

Tableau X: Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des échantillons de lait camelin

Paramètres	Lait collecté	
	Moyenne	Ecart type
pH	6.34	± 0.06
Acidité Dornic (°D)	18.03	± 0.12
Densité	1.022	± 0.0002
extrait sec total (g/l)	108.87	± 1.73
Matière grasse (g/l)	28.44	± 0.62
Lactose (g/l)	42.64	± 1.51
Protéines totales (g/l)	28.82	± 0.40
Protéines sériques (g/l)	8.29	± 0.24
Caséines (g/l)	20.98	± 0.1
Vitamine C (mg/l)	45.48	± 0.64

3.1.1 PH

La valeur moyenne du pH du lait de chamelle analysé est égale à $6,34 \pm 0,06$. Ces valeurs se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tels que SAWAYA *et al* (1984) (pH $6,49 \pm 0,024$) et ABU-TARBOUSH *et al* (1998) (pH 6.48) en Arabie Saoudite ; SIBOUKEUR (2007) (pH $6,31 \pm 0,15$) en Algérie et SBOUI *et al* (2009) (pH 6,41) et ARROUM *et al.*, 2015

(pH=6.59) en Tunisie . D'autres auteurs rapportent des valeurs plus élevées, tels que MEHAIA (1993) (pH 6.61 ± 0.02) et ABULEHIA (1994) (pH 6.55 ± 0.04) en Arabie Saoudite, KAMOUN (1995) (pH 6.51 ± 0.12) en Tunisie, SI AHMED- ZENNIA, (2015) en Algérie (pH=6.5).

Le pH ainsi que le goût du lait peuvent dépendre de la nature des fourrages et de la disponibilité de l'eau (GORBAN et IZZELDIN 1997).

SALEY (1993) estime que la teneur relativement élevée en vitamine C du lait de dromadaire, serait à l'origine du pH bas. Par ailleurs, le pH bas du lait camelin peut être attribué à la forte concentration en acide gras volatils selon YAGIL (1985).

D'après CAROLE (2002), ce paramètre dépendrait également de la présence de caséines et des anions phosphorique et citrique.

3.1.2. Acidité titrable

Les échantillons de lait analysés (tableau X), présentent une acidité titrable de l'ordre de $18.03^{\circ}\text{D} \pm 0,12$. Cette valeur plus élevée par rapport à celle du lait bovin qui est de l'ordre de 15°D (SAWAYA *et al*, 1984), se rapproche de celles rapportées par SIBOUKEUR (2007) soit $18,2^{\circ}\text{D} \pm 2,93$. Toutefois, de nombreux auteurs rapportent des valeurs supérieures ou égales à 15°D , tels que ABU-LEHIA (1994) en Arabie Saoudite ($15^{\circ}\text{D} \pm 4$) ; KAMOUN (1994) en Tunisie ($15.6^{\circ}\text{D} \pm 1.4$), SBOUI *et al.*, (2009) ($17,2^{\circ}\text{D}$) et ARROUM *et al.*, 2015 (18.64°D) en Tunisie, DJAMAN, 2018 en Algérie cite une fourchette entre $18,136 \pm 1,0627$ et $18,524 \pm 1,0929^{\circ}\text{D}$.

L'acidité titrable du lait dépendant du nombre de moles d'acides présents dans ce produit, est inversement proportionnelle à son pH (MATHIEU, 1998).

3.1.3. Taux de matière sèche

La teneur en matière sèche des échantillons de lait analysés est égale à 108.87 ± 1.73 (tableau X). Elle se situe dans la fourchette des travaux de GNAN *et al* (1994) (95.6 g/l) et de SIBOUKEUR (2007) ($113,11 \text{ g/l} \pm 10.58$).

L'une des principales caractéristiques du lait camelin est en effet sa teneur réduite en matière sèche par rapport à celle des laits d'autres espèces (BAYOUMI, 1990 ; RAMET,

1994 ; SIBOUKEUR, 2011 ; ARROUM *et al.*, 2015). Le lait bovin et humain ont des taux de matières sèches proches, soit respectivement 128 g/l et 129 g/l (ALAIS, 1984).

Ce paramètre varie également en fonction du stade de lactation (BENGOUMI *et al.*, 1994) ; le taux de MS diminue durant le mois suivant le vêlage, puis augmente suite à l'accroissement du taux des matières grasses et azotées (FAO 3, 1995).

3.1.4. Densité

La valeur de la densité des échantillons de lait de chamelle (tableau X) est égale à $1,022 \pm 0,0022$. Elle est comparable aux valeurs citées par SIBOUKEUR (2007) soit $1,022 \pm 0,0002$ et KAMOUN(1995) soit $1,028 \pm 0,002$. DJAMAN (2018) cite une fourchette comprise entre 1,028 et 1.030. La densité dépend directement de la teneur en matière sèche, liée fortement à la fréquence d'abreuvement (SIBOUKEUR, 2007).

La densité du lait de vache, est plus élevée que celle du lait de chamelle. Cette constatation a été évoquée par de nombreux auteurs (KAMOUN, 1995 ; ABIDI, 2001 ; RAMET, 2003 ; MAHBOUB, 2010). En effet, cette faible densité représente l'une des principales caractéristiques du lait de dromadaires et est en grande partie responsable des difficultés de sa transformation en fromage.

3.1.5. Teneur en matière grasse

La teneur moyenne en matière grasse du lait analysé, est égale à $28,44 \text{ g/l} \pm 0,62$. Elle est plus faible que celles des laits bovin (37g/l) et humain (45 g/l). Elle est comparable à celle rapportée par MEHAIA *et al.*, (1995) pour la race Hamra (28.5 g/l) et celle rapportée par SIBOUKEUR (2007) pour la race Sahraoui ($28 \text{ g/l} \pm 6$). Il est établi qu'en dehors de la race, le rang de la traite influe sur le taux de matière grasse. En effet, la traite du matin donne un lait relativement pauvre en matière grasse en comparaison avec celui des autres traites, bien que quantitativement plus important (KAMOUN, 1994).

ARROUM *et al.*, (2015) indiquent des valeurs variables selon le mode d'élevage 25 g/l , 32,66 g/l et 42,87g/l pour élevage intensif, semi-intensif et extensif respectivement. DJAMAN, (2018) rapporte une valeur de $30,97 \pm 4,0964$ g/l et SBOUI *et al.*, 2016 font état de valeurs un peu plus élevées soit 37.5 g/l.

Dans le lait camelin, les acides gras saturés (qui prédominent sur les insaturés) sont représentés principalement par les acides palmitique et stéarique, signalons que la matière grasse cameline est plus riche que celle du bovin en acides linoléique et palmitoléique(SIBOUKEUR, 2007).

3.1.6. Teneur en lactose

D'après les résultats compilés sur le tableau X , la teneur moyenne en lactose du lait camelin est égale à $42,64 \pm 1,51$ g/l. Cette teneur paraît comparablement à celle du lait bovin (44.13 g/l), mais elle est plus faible que celle du lait humain (70 g/l). Elle se situe dans la fourchette des travaux rapportés par SIBOUKEUR (2007) ($43,87 \text{ g/l} \pm 3,10$ pour la race Sahraoui) et MEHAIA *et al.* (1995) pour les races Hamra, Majaheem et Wardah (44 g/l, 44.3 g/l et 44.4g/l respectivement) et SBOUI *et al.*, 2016 (42.78 g/l).

3.1.7. Teneur en vitamine C

La teneur en vitamine C des échantillons analysés de lait cru est égale à $45,48 \text{ mg/l} \pm 0,64$. Elle est comparable à celle rapportée par SIBOUKEUR (2007) soit $41,40 \text{ mg/l} \pm 8,20$ et inférieure à celle enregistrée par SBOUI *et al.*, (2016) soit $169,73 \text{ mg/l} \pm 5,12$. FARAH *et al* (1992) et HADADDIN *et al.*, (2008) mentionnent des proportions nettement plus faibles (24.9 mg/l et 33mg/l, respectivement)

Malgré cette variabilité, il demeure entendu que la teneur en vitamine C du lait camelin est très largement au delà du seuil relevé dans le lait bovin qui se situe autour de 20 mg/l. Cette caractéristique rehausse davantage l'intérêt nutritionnel du lait de dromadaire pour son apport important en cette vitamine au bénéfice des populations nomades souvent privées de fruits et légumes frais.

3.1.8 Teneur en protéines totales

Les résultats consignés dans le tableau X indiquent une teneur moyenne en protéines totales de lait cru est égale à $28,82 \pm 0,40$ g/l. Celle-ci se rapproche de celles du lait bovin (32 g/l) et est deux fois plus élevée par rapport à celle du lait humain (12 g/l). Le taux que nous avons relevé lors de la présente étude se situe dans la fourchette des travaux cités par MOHAMED *et al* (1989) et GNAN *et al* (1994) à savoir 46g/l et 21.5 g/l respectivement. Il est plus faible que celui rapporté par SIBOUKEUR (2007) à savoir $35,68 \text{ g/l} \pm 5,64$ et SBOUI

et al., 2016 soit 34.15 g/l \pm 3.11. Il est toutefois comparable à celui rapportés par MEHAIA *et al* (1995) pour les races Majaheem et Hamra (29.1 g/l et 25.2 g/l) et ALLOUI-LOMARKIA *et al.*, 2007 (29.42g/l).

La teneur protéique, varie en fonction des stades de lactation. Selon KAMOUN (1994), les deux premiers mois de lactation se caractérisent par une diminution des taux, protéinique et butyreux du lait camelin. Ces derniers atteignent une valeur minimale coïncidant avec le pic de lactation, puis retrouvent, en fin de lactation, un niveau comparable à celui de départ.

3.1.9 Teneur en protéines sériques

La teneur en protéines sériques du lait camelin cru analysé est égale à 8,29 \pm 0,24 g/l. (tableau X), ce qui représente 28.76 % des protéines totales. Ce taux semble se rapprocher de celui des laits, bovin (6 g/l) et humain (7 g/l).

Ce taux comparable à celui rapporté par SI AHMED- ZENNIA, 2015 soit 8 g/l et BOUDJENAH, 2012 soit 9.21 et ALLOUI-LOMARKIA *et al.*, 2007 (8.40g/l). Il semble légèrement supérieur à celui rapporté par SIBOUKEUR (2007) soit 7,51g/l \pm 0,50 et par FARAH (1993) soit (7g/l). Des teneurs supérieures sont évoquées par d'autres auteurs

soient 10g/l, selon BAYOUMI (1990), et 11,2 \pm 0.6g/l pour la race *Majaheem*, selon ABULEHIA (1994) et (40 g /l) HADDADIN *et al.*, 2008.

3.1.10 Teneur en caséines

La teneur moyenne en caséines des échantillons de lait analysés est égale à 20,98 \pm 0.1 g/l, soit 72.79 % des protéines totales. Elle est plus faible que celles des caséines bovines égales à 26 g/l (soit 81 % des protéines totales). Elle est en revanche nettement supérieure à celle du lait humain égale à 5g/l (soit 42 % des protéines totales). Cette teneur est située dans la fourchette citée par ABULEHIA (1987) 19g/l et KAMOUN (1995) (23 g/l), et semble plus faible que celle rapportées par certains auteurs tels que SIBOUKEUR (2007) (28,15g/l \pm 5,28, soit 79% des protéines totales), BOUDJENAH, 2012 (27.77 g/l), ALLOUI-LOMARKIA *et al.*,2007 (19.80 g/l), SI AHMED ZENNIA, 2015 (23 g/l, soit 73% des protéines totales).

3.2. Caractérisation microbiologique du lait collecté

Dans cette partie nous avons procédé au test de la réductase, à la recherche, au dénombrement et à l'évolution durant la fermentation spontanée du lait, de 3 groupes bactériens susceptibles de contaminer ce lait.

3.2.1 Qualité hygiénique du lait collecté

*Test de la réductase

La plupart des bactéries en se multipliant dans le lait sont capables, grâce à l'action de leur réductase, d'abaisser le potentiel d'oxydo-réduction jusqu'à la décoloration d'un indicateur rédox. On utilise généralement le bleu de méthylène dont la forme réduite est incolore.

Cette méthode d'estimation est approximative. En effet, l'activité réductrice des cellules

microbiennes dépend non seulement de leur nombre, mais aussi des espèces présentes et de

leur état physiologique (les streptocoques de mammites ne décolorent pas le bleu de méthylène). De plus, le colorant peut être réduit par les cellules somatiques de l'animal qui peuvent se trouver dans le lait (GUIRAUD, 1998), ce qui peut fausser les résultats du test.

La décoloration d'échantillon du lait cru analysé (tableau IX) est survenue après deux heures et demi. Nous pouvons considérer cet échantillon comme étant de qualité bonne à passable (LARPENT, 1997).

Tableau XI : Test de la réductase

Echantillons	Temps de décoloration du bleu de méthylène
Lait cru	2 heures 30 min.
Lait pasteurisé à 63°C/20 min.	> 5 heures
Lait pasteurisé à 72°C/15sec.	> 5 heures
Lait pasteurisé à 85°C/2 min.	> 5 heures

Il ressort du tableau XI que la décoloration du BM (bleu de méthylène) dans le cas des échantillons pasteurisés survient au-delà de 5 heures (versus 2h 30 min. pour le lait cru). Ceci

est dû à l'efficacité du traitement physique (contrôle positif) et ce quelque soit le barème appliqué.

3.2.2. Dénombrement de trois principaux groupes bactériens de contamination du lait camelin

La recherche et le dénombrement de trois groupes bactériens susceptibles de contaminer le lait camelin du fait des conditions de traite souvent non conformes et de sa salinité prononcée, ont donné les résultats illustrés dans le tableau XI

La flore halotolérante : l'utilisation du milieu spécifique (milieu CHAPMAN) a permis de détecter la présence des bactéries halotolérantes, notamment les staphylocoques et de les dénombrer (MARCHAL *et al*, 1982 ; PITON, 1988).

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies rouges qui ne modifient pas la teinte du milieu.

Dans le cas de la présente étude, nous avons détecté la présence des deux types de colonies. Nous avons les avons alors dénombrés. Leur taux a été estimé à 7.76×10^3 UFC/ml (tableau XII). Comparé aux spécifications relatives au lait de référence, ce taux dépasse les normes requises ce qui semble être dû à la salinité prononcée du lait de dromadaires.

Dans ce contexte, les critères microbiologiques fixés par la réglementation algérienne ou internationale pour le lait de référence cru, ne mentionne pas le taux de staphylocoques (pathogènes et non pathogènes) mais indique les staphylocoques à coagulase+ ou les *Staphylococcus aureus*.

La norme AFNOR (Arrêté des 6 août 1985 et 30 mars 1994) pour le lait bovin cru destiné à la vente, indique que le taux de *Staphylococcus aureus* ne doit pas excéder 10^2 germes / ml. . L'Arrêté interministériel du 24 janvier 1998 (Journal officiel N° 35), précise l'absence de *Staphylococcus aureus* dans 0.1 ml de lait. Selon l'arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016, relatif aux spécifications microbiologiques du lait cru (Journal officiel N° 39), le nombre maximal tolérable pour les staphylocoques à coagulase + se situe entre 10^2 et 10^3 UFC/ml).

Les coliformes : l'utilisation du milieu spécifique VRBL, incubée 24 h à 30 °C (LARPENT *et al.*, 1997 ; GUIRAUD, 1998) a permis de détecter la présence de colonies rouges violacée (lactose +), entourées d'un halo rouge de précipitation biliaire d'un diamètre égale ou supérieur à 0,5 mm correspondant aux coliformes (AFNOR, 1996).

Leur taux enregistré est estimé à 9.13×10^2 UFC/ml. Comparé aux spécifications relatives au lait de référence, ce taux dépasse les normes requises ce qui semble être dû aux conditions de traite non conformes.

La norme AFNOR (Arrêtés des 6 août 1985 et 30 mars 1994) pour le lait cru destiné à la vente, indique des taux inférieurs à 10^2 cellules / ml au conditionnement et à 10^3 cellules / ml à la DLC (date limite de consommation).

Tableau XII : Dénombrement des trois groupes bactériens de contamination du lait camelin cru et soumis à la pasteurisation

Groupe de micro-organismes	Nombre de germes (UFC/ml)			
	Lait cru	Lait pasteurisé à 63°C/20min	Lait pasteurisé à 72°C/15 sec	Lait pasteurisé à 80°C/2min
Bactéries halotolérantes	7.76×10^3	-	-	-
Entérobactéries	5.02×10^2	-	-	-
Coliformes	9.13×10^2	-	-	-

- absence totale

La recherche et le dénombrement de ces trois principaux groupes bactériens de la flore pathogène du lait avant et après la pasteurisation selon les différents barèmes a permis d'obtenir les résultats portés dans le tableau XII. L'effet destructeur de la pasteurisation sur les groupes de bactéries pathogènes testés et ce quelque soit le barème utilisé est considéré comme un contrôle positif. Ces bactéries étant sensibles à la chaleur, constituent en effet, un bon témoin de l'efficacité des traitements thermiques et/ou d'une recontamination (GUIRAUD, 1998).

3.2.3 Mise en évidence de l'effet autoépuratif du lait camelin, comparaison avec l'effet épuratif de la pasteurisation

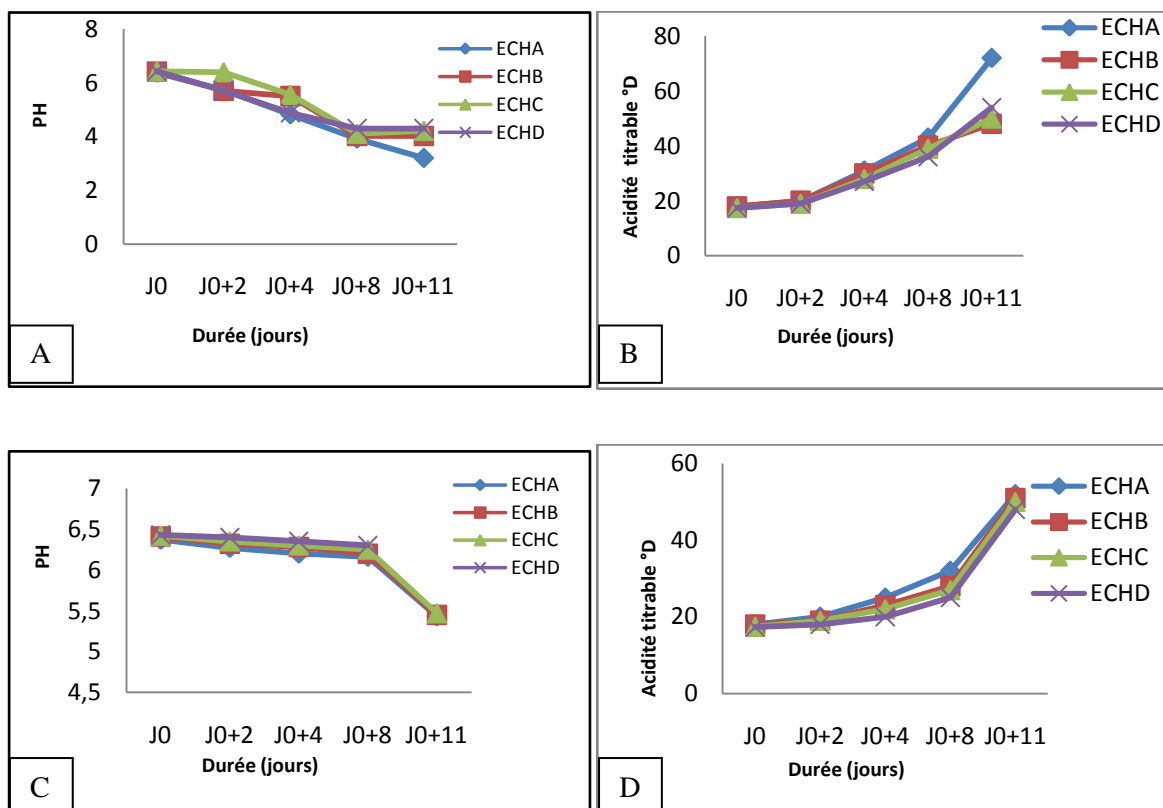
Localement, le lait de chamelle est généralement consommé à l'état frais ou fermenté. Durant sa fermentation, il a été constaté que le taux de bactéries lactiques (flore indigène) augmentait et que celui des bactéries de contamination diminuait (SIBOUKEUR, 2007, ZADI KARAM *et al.*, 2003, CHETHOUNA *et al.*, 2018) . Il s'agit d'un phénomène d'autoépuration, naturel, qui existe dans les laits des autres espèces laitières où sa durée est limitée à quelques heures (6 h au maximum selon les conditions du milieu) qui suivent la traite. Dans la présente étude, nous avons essayé de comparer l'effet de ce système naturel à celui de la pasteurisation. Le lot de lait cru et les trois autres soumis chacun respectivement à la pasteurisation basse (63°C/20min.), la pasteurisation haute (85°C/2min.) et la haute température à court temps ou High Temperature Short Time (HTST) (72°C/15 sec.) ont été entreposés à la température ambiante (25°C environ). Des lots témoins ayant subi les mêmes traitements et stockés à 4°C ont servi comme deuxième contrôle positif : effet bactériostatique de la réfrigération).

3.2.3.1 Evolution du pH et de l'acidité titrable du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée (entreposé à la température ambiante (25°C))

Au cours de leur entreposage les échantillons de lait cru s'acidifient légèrement comparativement aux échantillons traités thermiquement (figure 11A et 11B). Ceci est dû à l'augmentation inévitable de la charge microbienne durant l'entreposage du lait cru. La figure (1A) montre que le pH diminue mais assez lentement. A J0+4 (5^{ème} jour d'entreposage), tous (les échantillons de lait pasteurisés et cru) présentent des pH supérieurs au pH isoélectrique des caséines camelines (pH=4,3), A J0+8, le pH oscille autour de 4,3 et 3,92. La valeur enregistrée de l'acidité titrable confirme cette tendance relativement lente qui toutefois, n'excède pas 43°D à J0+8. Cette acidité atteint au bout du 12^{ème} jour (J0+11), des valeurs comprises entre 48 et 54°D pour les échantillons pasteurisés. Cette lenteur dans l'acidification du lait camelin lors de sa fermentation a fait l'objet de nombreuses citations. Elle serait due selon les auteurs au pouvoir tampon relativement plus élevé du lait de dromadaires, par rapport à celui du lait des autres espèces (SAWAYA *et al.*, 1984). Ces résultats sont confortés par ceux obtenus avec les échantillons réfrigérés (figure 11C et 11D). Pour les échantillons conservés à 4°C, l'acidité titrable tourne autour de 20°D (J0+4). Ce

comportement peut être expliqué par le ralentissement de l'activité métabolique des bactéries par le froid (SBOUI *et al.*, 2009).

Par ailleurs, cette lenteur dans l'acidification du lait de chamelle, rapportée par la littérature, peut être expliquée par l'effet auto-épuratif du lait de chamelle, supérieur à celui du lait des autres espèces laitière et dont la durée est limitée à quelques heures selon les saisons. Ce phénomène serait lié selon de nombreux auteurs, à la richesse du lait camelin en protéines protectrices du sérum (lysozyme et en lactoperoxydase, lactoferrine, PP3, immunoglobulines) et en bactériocines produites par les bactéries lactiques, ce qui prolonge sa durée de conservation. Ce comportement particulier est d'ailleurs en grande partie, responsable des difficultés de transformation fromagère du lait de cette espèce laitière (FARAH *et al.*, 1990 ; RAMET, 1994 ; KAMOUN, 1995 ; ABOU-TARBOUSCH *et al.*, 1998).



ECHA : échantillon de lait cru ;ECHB : échantillon de lait pasteurisé à 63°C/20 min ; ECHC : échantillon de lait pasteurisé à 72°C/15 sec ECHD : échantillon de lait pasteurisé à 85/2 min

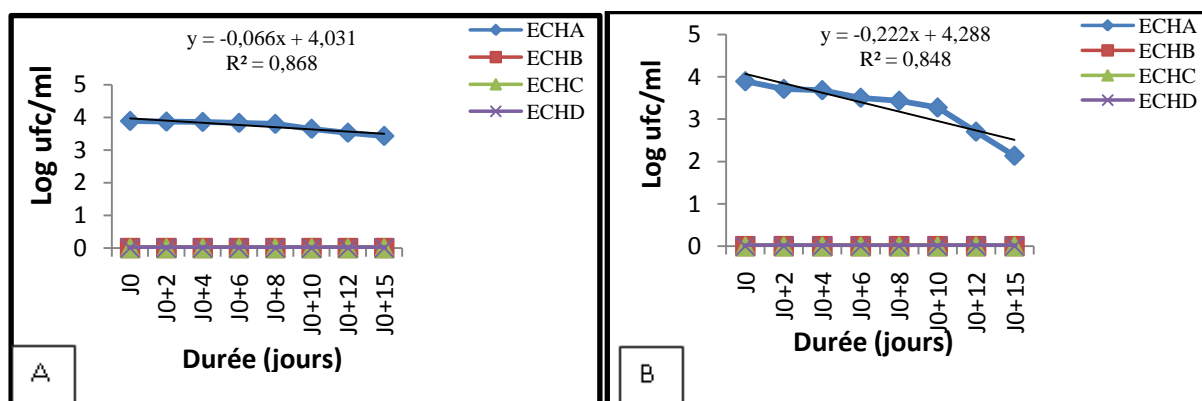
**Figure 11 : Evolution du pH et l'acidité titrable durant l'entreposage
A et B à la température ambiante.
C et D à température (4°C)**

Il est important de souligner que d'après les résultats que nous avons enregistrés, le lait de chamelle pasteurisé semble pouvoir se conserver jusqu'aux 9 jours à 4°C.

3.2.3.2 Evolution quantitative de la flore halotolérante du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée

Les germes halotolérants, dont le taux initial (à J0) est de l'ordre de 7.76×10^3 ufc/ml pour l'échantillon de lait cru, a tendance à diminuer progressivement en fonction de la durée de l'entreposage à 25°C et à 4°C. Ce taux atteint $2,74 \times 10^3$ et 1.36×10^2 à J0+15 ufc/ml, respectivement.

Cette diminution est ainsi plus accentuée pour l'échantillon entreposé à 4°C (figure 12B). Ceci suggère un effet anti-microbien renforcé par l'action bactériostatique de la réfrigération. SIBOUKEUR (2007) a également rapporté cet effet antibactérien du système protecteur naturel du lait camelin contre la flore à GRAM +, notamment contre la flore halotolérante.



ECHA : échantillon de lait cru ;ECHB : échantillon de lait pasteurisé à 63°C/20 min ; ECHC : échantillon de lait pasteurisé à 72°C/15 sec ECHD : échantillon de lait pasteurisé à 85/2 min

Figure 12: Evolution de la flore halotolérante durant l'entreposage du lait

A : à température ambiante (25°C)

B : à température (4°C)

De ce qui précède, il en ressort que le taux des bactéries halotolérantes à J₀ estimé à 7.76×10^3 UFC/ml dans le lait cru dépasse les normes algériennes préconisées pour le lait de référence. Le taux de ces germes dans le lait camelin stocké à 25°C environ et 4°C est estimé à J0+15 respectivement à $2,74 \times 10^3$ et 1.36×10^2 UFC/ml. Les normes algériennes relatives au

lait fermenté (Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016) tolèrent des taux compris entre 3×10^2 à 3×10^3 . Il semblerait par conséquent qu'un effet bactéricide (et bactériostatique à 4°C) s'est opéré lors de la fermentation du lait et lors son stockage à 4°C.

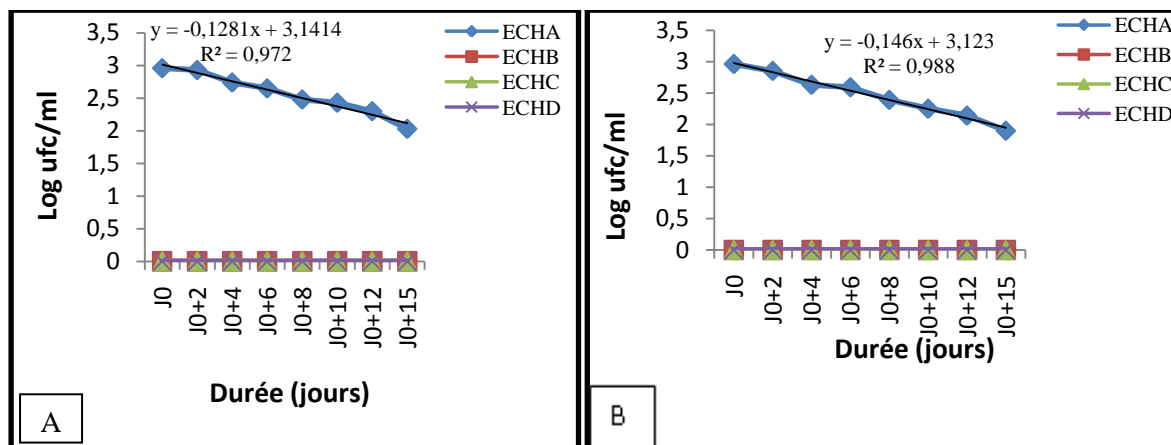
3.2.3.3 Evolution quantitative des coliformes du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée

L'évolution des coliformes dans l'échantillon de lait cru entreposé à la température ambiante (25°C environ) et à 4°C est illustré par les figures (13 A et 13 B) respectivement. Cette flore de contamination, dont le taux initial est égale à 9.13×10^2 ufc/ml, diminue au cours de l'entreposage soit à la température ambiante et après réfrigération. Il atteint à J0+2, 8.70×10^2 ufc/ml à la température ambiante et 7.20×10^2 ufc/ml à 4°C. Ce taux passe à 5.5×10^2 ufc/ml et 4.3×10^2 ufc/ml respectivement à J0+4. Il finit par atteindre $1,09 \times 10^2$ ufc/ml et 8×10 ufc/ml respectivement à J0+15. Ce comportement est conforté par les résultats des travaux rapportés par SIBOUKEUR (2007).

Les résultats enregistrés pour les échantillons réfrigérés montrent l'effet bactériostatique (contrôle positif) qui s'additionne à l'effet antibactérien naturel du lait camelin (synergie).

Quelque soit le couple température / temps appliqué, les coliformes sont absents dès J0 dans le cas des échantillons pasteurisés (contrôle positif).

Etant donné qu'au même moment l'acidité dornic des échantillons analysés n'est pas élevée (entre 18 et 43°D) jusqu'à (J0 +8), les résultats enregistrés sont de nature à suggérer que cette flore n'est pas inhibée par l'acidité mais par d'autres facteurs présents dans le milieu tels que les protéines et peptides à activités antimicrobiennes, dont la présence et le rôle dans le lait camelin ont été signalés par différents auteurs (BARBOUR *et al.* 1984 ; KAMOUN ,1994).



ECHA : échantillon de lait cru ;ECHB : échantillon de lait pasteurisé à 63°C/20 min ; ECHC : échantillon de lait pasteurisé à 72°C/15 sec ECHD : échantillon de lait pasteurisé à 85/2 min

Figure 13: Evolution des coliformes durant l'entreposage du lait

A : à température ambiante (25°C)

B : à température (4°C)

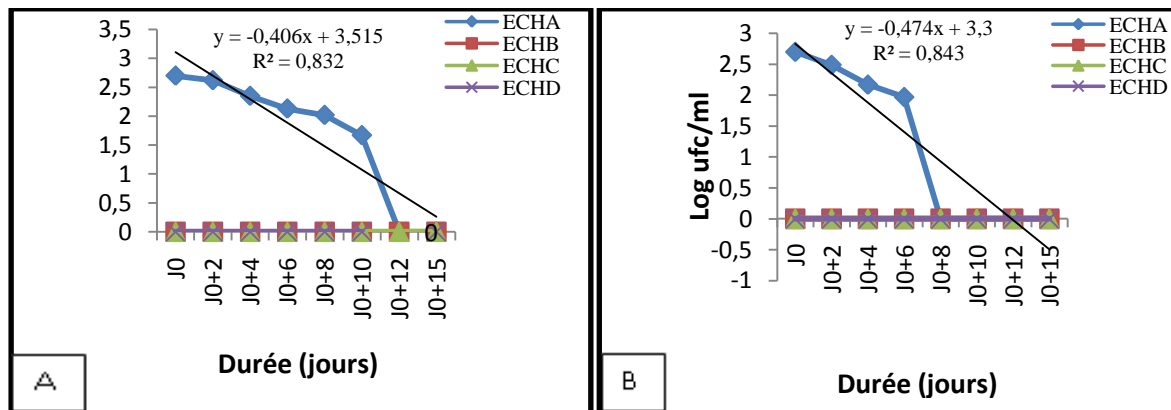
La quantité de coliformes dans le lait camelin cru ($9,13 \times 10^2$ ufc/ml à J0) témoigne de l'absence d'hygiène lors de la traite notamment. Durant la fermentation, le lait semble subir une autoépuration qui se manifeste par la diminution de la charge des coliformes dont le nombre passe à J₀+15 à $1,09 \times 10^2$ ufc/ml et 8×10 ufc/ml respectivement pour un entreposage à 25°C et 4°C. La norme algérienne préconise un taux de coliformes totaux pour un lait fermenté compris entre 3×10^4 et 3×10^5 (Journal officiel N° 39).

3.2.3.4 Evolution quantitative des entérobactéries du lait cru et pasteurisé soumis à une fermentation spontanée (25°C environ)

Les entérobactéries présents dans l'échantillon A (de lait cru), entreposé à (25°C) et à (4°C) et dont le taux initiale est égale à $5,02 \times 10^2$ ufc/ml diminuent durant l'entreposage (figure 14A et figure 14B). Cette constatation expérimentale semble toutefois plus nette pour les échantillons de lait réfrigérés, Il atteint à J0+4 ($2,25 \times 10^2$) ufc/ml pour échantillon entreposé à 25°C et $1,5 \times 10^2$ ufc/ml pour échantillon entreposé à 4°C. Il s'agit d'un effet synergique anti-bactérien (auto épuration) et bactériostatique (réfrigération).

Cette diminution est importante, notamment à J0+12 dans le cas des échantillons de lait cru entreposés à (25°C) et à J0+8 dans ceux entreposés à (4°C) où nous avons constaté une

disparition totale des entérobactéries. Ceci peut être expliqué vraisemblablement par les effets conjugués des substances inhibitrices contenues dans le lactosérum (lysozyme et en lactoperoxydase, lactoferrine, PP3, immunoglobulines) et/ou celles produites par les bactéries lactiques peroxyde d'hydrogène, acides organique et bactériocines). Les bactéries lactiques sont en effet, de très bons producteurs de ces substances antibactériennes de nature peptidique ou protéique.



ECHA : échantillon de lait cru ; *ECHB* : échantillon de lait pasteurisé à 63°C/20 min ; *ECHC* : échantillon de lait pasteurisé à 72°C/15 sec *ECHD* : échantillon de lait pasteurisé à 85/2 min

Figure 14 : Evolution des entérobactéries durant l'entreposage du lait

A : à température ambiante (25°C) B : à température (4°C)

Au bout du jour (à J₀+12) ce groupe microbien finit par disparaître dans le lait fermenté. Dans le cas des échantillons réfrigérés cette disparition survient plus tôt (à J₀+8).

Les normes algérienne et internationale préconisent l'absence totale de ces germes dans le lait sous toute ses formes (Journal officiel N° 35 ; Journal officiel N° 39 ; AFNOR, 1996).

3.2.4 Isolement et culture des souches lactiques indigènes

Un isolement des souches lactiques indigènes potentiellement responsables de l'effet auto-épuratif du lait camelin (RODRIGUEZ *et al.*,2002 ; MALDONADO *et al.*,2003; LABIOUI *et al.*, 2005 ; TODOROV et DICKS, 2005 ; BOUMHIRA *et al.*,2011 ; MERZOUK, 2015) a été réalisé. Les milieux MRS, M17 et MSE ont été utilisés pour leur caractère sélectif.

Une pré-identification basée sur des observations macroscopiques, microscopiques, et sur des tests physiologiques et biochimiques a permis de retenir 38 souches.

3.2.4.1. Caractérisation macroscopique des souches indigènes isolées

L'étude de l'aspect macroscopique des souches développées sur les milieux MRS et M17 a révélé des colonies opaques, de petites tailles, rondes, lisses, de couleur crème (photo 4 A et B). Sur le milieu MSE, les colonies apparaissent transparentes gluantes avec un aspect gélatineux (photo 4 C).

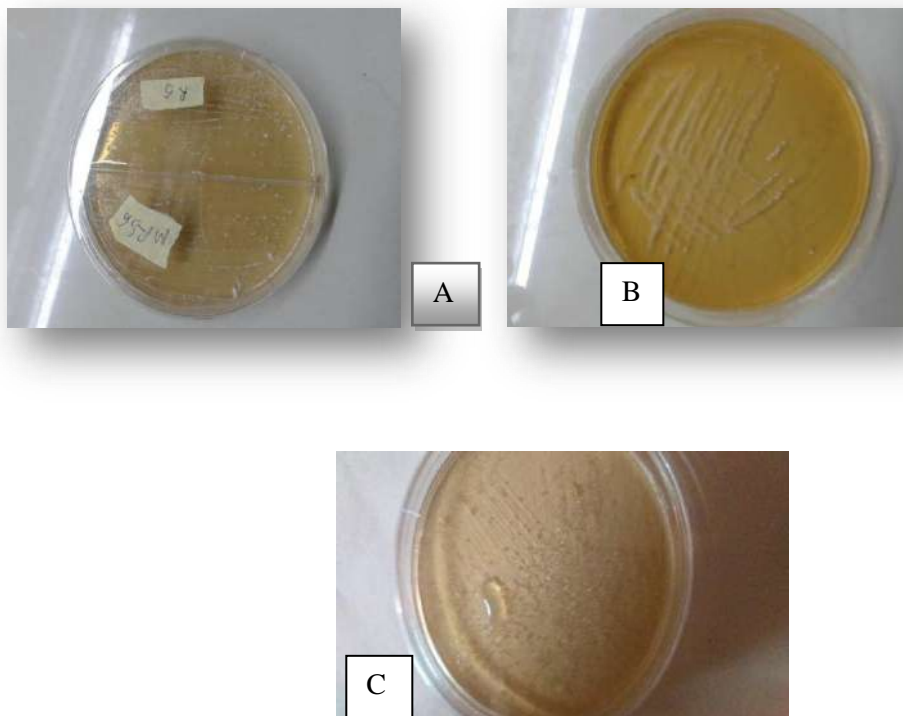


Photo 4 : Aspect macroscopique des colonies isolées à partir du lait camelin

A : sur milieu MRS B : sur milieu M17 C : sur milieu MSE

3.2.4.2 Caractérisation microscopique des souches indigènes isolées

L'aspect microscopique après coloration de GRAM a révélé que certaines cellules sont en forme de coques et d'autres en forme de bâtonnets. Elles sont rassemblées par paires ou en courtes chainettes incurvées (Annexe 03). Parmi les colonies isolées, 38 souches à GRAM positif et à catalase négative

3.2.4.3. Caractérisation physiologique et biochimique des souches indigènes isolées

Les analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques ont révélé une diversité des 38 souches bactériennes isolées, que nous avons réparties en 4 genres (Figure 15) :

lactococcus (36.84%), lactobacillus (34.21%), enterococcus (15.78%), leuconostoc (13.78%).

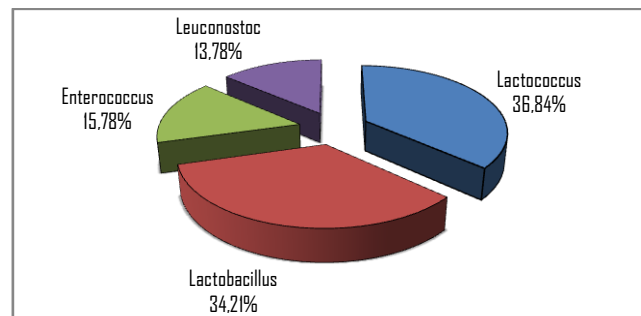


Figure 15 : Distribution des isolats lactiques en fonction des genres

La pré-identification des isolats est réalisée selon (STILES et HOLZAPFEL, 1997 et CARR *et al.*, 2002 ; VOS *et al.*, 2009, GUIRAUD, 2012) et la confirmation des résultats par des galeries API 50 CH pour les lactococcus, les leuconostocs et les lactobacillus. Des galeries API 20STRP ont été utilisées pour les enterocoques.

❖ Genre lactococcus

L'ensemble des souches regroupées dans ce genre sont homofermentaire et peuvent croître à 10°C et ont présenté une hémolyse γ toutes les souches sont pourvues d'un caractère non hémolytique. L'absence d'activité hémolytique indique que ces souches ne sont pas virulentes (KHODJA, 2018) (photo7). Ces souches n'hydrolysent pas l'amidon mais hydrolyse l'esculine. Le profil fermentaire établi selon la méthode classique se trouve dans le tableau XIII.

Au vu des résultats obtenus, nous pensons qu'il est fort probable que les souches regroupées dans ce genre fassent partie de l'espèce « *Lactococcus lactis* ». Certaines souches sont

capable de croître à 45°C et à 6.5% de NaCl ce qui caractérise l'espèce *Lactococcus Lactis*. Signalons que la littérature indique que l'espèce *Lactococcus Lactis* ne pousse pas à cette température et à cette concentration de NaCl, cependant en 2009, DRICI *et al.*, ont isolé à partir du lait cru de chamelle une espèce *Lc.lactis ssp lactis var diacétylactis* qui se développe à 50°C. L'identification de cette espèce a été réalisée par des méthodes moléculaires. ZADI KARAM et KARAM (2006) ont mis en évidence la présence de *Lactococcus* résistante à 6.5% de NaCl dont l'identification de l'espèce a été réalisée par analyse de leurs protéines solubles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

- Parmi ces espèces, certaines souches sont capables de produire l'acétoïne et du CO₂ à partir du citrate et sont ADH négatif (photo 5 et 6,8). Il est probable dans ces conditions qu'elles appartiennent à l'espèce *Lc.lactis ssp cremoris* (GUIRAUD, 2012)
- d'autres sont ADH positif, ne produisent pas de l'acétoïne et du CO₂ à partir du citrate et n'utilisent pas le citrate. Il s'agit probablement de *Lc.lactis ssp Lactis*. (photos 5,6 et 8)
- d'autres sont ADH positif, produisent acétoïne et CO₂ à partir du citrate et utilisent le citrate. Il pourrait probablement s'agir de l'espèce *Lc.lactis ssp lactis var diacétylactis*. (photos 5,6 et 8)

Les trois souches Lc6, Lc5 et Lc3, subissent une autre pré-identification pour confirmation faisant appel à des galeries API 50 CH. Les résultats de ces mini-tests sont consignés dans le tableau XIV.



Photo 5 : Production d'acétoïne
T : témoin **Lc** : *Lactococcus* **Ln** : *Leuconostoc*
En : *Enterococcus*



Photo 6 : Production de CO₂ à partir du citrate

T : témoin **Lc** : *Lactococcus* **En** : *Enterococcus*



Photo 7: Caractère hémolytique (hémolytique γ)

❖ Genre *Lactobacillus* :

Nous avons isolé treize souches dont les cellules en forme de bâtonnets ne produisent pas de CO₂ à partir du glucose et présentent une capacité de croître à 15°C et une croissance variable à 45°C. Ils sont ADH négative, esculine positive et ne produisent pas de dextrane.

Les bactéries homofermentaires et mésophiles appartiennent selon la littérature au groupe « *Streptobacterium* », celles à caractères homofermentaire et thermophile au groupe « *Thermobacterium* » et celles à caractères hétérofermentaire et mésophile au groupe « *Betabacterium* » (COLLINS *et al.*, 1987; SCHLEIFER et LUDWIG, 1995 ; CHARTERIS *et al.*, 2001 ; HAMMES et HERTEL, 2003 ; GUIRAUD, 2012).

Les souches que nous avons isolées semblent par conséquent faire partie du groupe « *Streptobacterium* », La différenciation entre les différentes espèces du genre *lactobacillus* repose essentiellement sur leur faculté de fermenter différemment les carbohydrates (Tableau XIII). Les treize souches isolées lors de la présente étude, présentent le même profil fermentaire.

Les résultats que nous avons obtenus comparables à ceux relatifs à des souches de référence dans la clé d'identification de Bergey's Manual of Systematic (VOS *et al.*, 2009) et (STILES et HOZPFEL, 1997 ; CARR *et al.*, 2002 ; GUIRAUD, 2012), nous laissent supposer qu'il pourrait s'agir d'une souche de « *Lactobacillus plantarum* ». Cette hypothèse semble confortée par les travaux de ZADI KARAM et KARAM (2006) qui rapportent que la seule espèce du genre *Lactobacillus* trouvée dans le lait de chamelle est *Lactobacillus plantarum*.

Parmi ces treize souches, nous en avons soumis l'une d'entre elles à des mini tests d'identification galerie API CH 50 Le résultat de ce test est regroupé dans le tableau XIV.

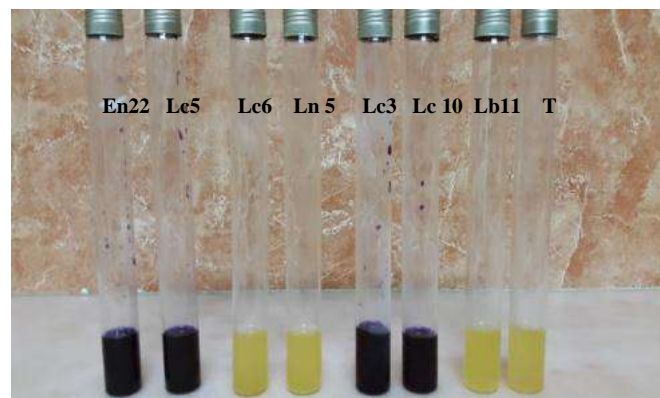


Photo 8: Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)
Test positif : virage du milieu au jaune puis au violet
Test négatif : virage du milieu au jaune et persistance de la couleur jaune

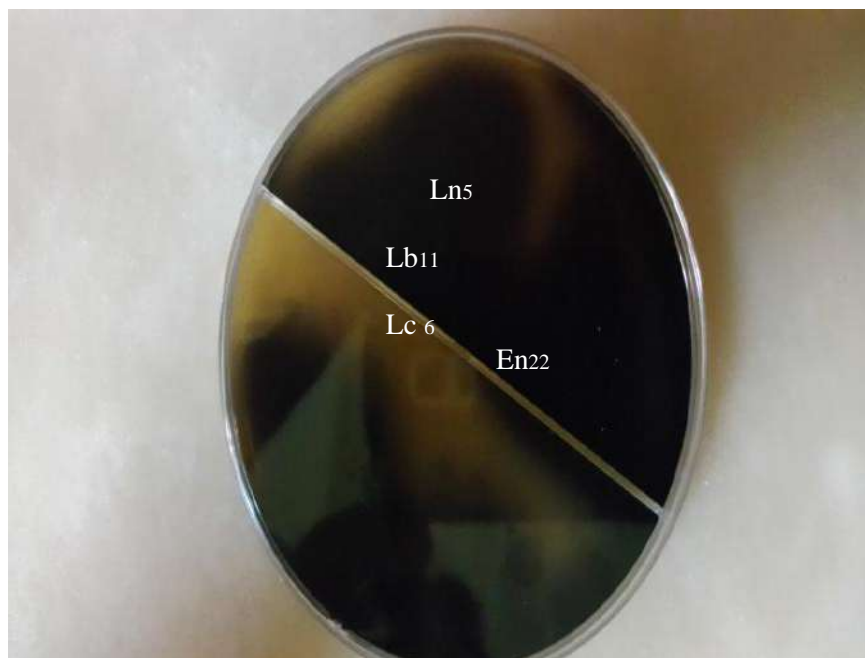


Photo 09 : Hydrolyse de l'esculine
Test positif : noircissement du milieu
Test négative : le milieu garde la couleur initiale (beige- marron)

❖ Genre *Leuconostoc*

L'identification des souches de *leuconostoc* a été réalisée selon le schéma de la démarche dichotomique des espèces de *Leuconostoc* sp. proposé par CARR *et al.*, (2002) et selon la classification proposée par SCHLEIFER et LUDWIG (1995) ; BJORKROTH *et al.*, (2006) et GUIRAUD (2012). Les souches que nous avons regroupé dans ce genre sont toutes hétérofermentaires et produisent le dextrane. Toutes ces souches enregistrent les mêmes résultats aux tests :

- hétérofermentaires et acétoïne négative ;
- croissance à 37°C, résistante à 55°C pendant 15min.
- hydrolyse de l'esculine (photo9) ;

Le profil fermentaire réalisé par des tests classiques (tableau XIII) est confirmé pour une souche par les résultats obtenus avec la galerie api 50 CH (tableau XIV).

Ces résultats sont de nature à suggérer qu'il s'agirait peut être d'une souche de « *Leuconostoc mesentéroïdes ssp mesenteroides* car il hydrolyse l'arabinose (tableau XIII) qui est le sucre clé de différenciation entre les sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides* (ZARROUR *et al.*, 2012)



Photo 10 : Croissance des leuconostocs à 37°C
Milieu devient visqueux

❖ **Genre *Enterococcus*** : toutes les souches du genre *Enterococcus* donnent des résultats positifs aux différents tests : croissance à 10 et 45°C, à 6.5% de NaCl, pH 9.6, thermorésistance 30mn à 63°C, hydrolyse l'arginine et l'esculine, production d'acétoïne, possibilité de croissance à 0.1% de lait de Sherman. Elles n'hydrolysent pas l'amidon et sont gélatinase négatif sauf En24. Elles n'utilisent pas le citrate et ne produisent pas de CO₂ à partir du citrate, et sont toutes hémolyse (Y) sont non hémolytiques (photo7 et tableau XIII).

L'absence d'activité hémolytique chez les bactéries lactiques indique que ces bactéries ne sont pas virulentes LAMARI (2014) ; KHODJA (2018). Leurs profils fermentaires sont présentés dans le tableau XIII.

Après comparaison de ces résultats avec ceux mentionnés par (VOS *et al.*, 2009 ; GALVEZ, 2012 et GUIRAUD, 2012) et une confirmation concevable avec l'utilisation des galeries API 20 STREP , nous pensons qu'il puisse peut être s'agir de l'espèce *Enterococcus durans*.

Tableau XIII : Critères de pré-identification des isolats lactiques (genres *Lactococcus*, *Enterococcus* , *Lactobacillus* et *Leuconostoc*)

Groupe		1	2	3	4	5	6
Forme		Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	cocci	Batonnets
Nombre d'isolats		6	4	4	6	5	13
Coloration de Gram		+	+	+	+	+	+
Test de Catalase		-	-	-	-	-	-
CO ₂ à partir de glucose		-	-	-	-	+	-
Hémolyse		∇	∇	∇	∇	ND	ND
Arginine dihydrolase		+	+	-	+	-	-
Hydrolyse l'amidon		-	-	-	-	ND	ND
Hydrolyse l'esculine		+	+	+	+	+	+
Croissance à Température (°C)	10	+	+	+	+	ND	ND
	15	ND	ND	ND	ND	ND	+
	37	ND	ND	ND	ND	+	ND
	45	-	V	V	V	ND	V
Résistance à	63°C/30 min	+	+	V	+	ND	ND
	60°C/90 min	ND	ND	ND	ND	ND	+
	65°C/30 min	ND	ND	ND	ND	ND	+
	55°C/15 min	ND	ND	ND	ND	+	ND
pH	9.6	-	+	+	+	ND	ND
	3.9	ND	ND	ND	ND	ND	+
NaCl (%)	4	+	+	+	+	ND	+
	6.5	-	V	V	+	ND	+
Production de Acétoïne		-	+	+	+	-	ND
CO ₂ sur citrate		-	+	+	-	ND	ND
Dextrane		ND	ND	ND	ND	+	-
Utilisation de citrate		-	+	+	-	ND	ND
Gélatinase		-	-	-	V	ND	ND
Lait de shermane		+	+	+	+	ND	ND
Fermentation des sucres :							
Lactose		+	+	+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+	+	+
Mannitol		-	-	-	-	-	+
Saccharose		+	+	+	+	+	+
Fructose		ND	ND	ND	+	+	+
Xylose		+	+	-	-	+	-
Arabinose		ND	ND	ND	ND	+	+
Raffinose		-	-	-	-	ND	+
Rhamnose		-	-	-	+	ND	-
Ribose		+	+	-	+	ND	+
Espèce probable		Lc.lactis subsp. lactis	Lc.lactis subsp. Lactis var diacetylactis	Lc.lactis subsp cremoris	Enterococcus Durans	Ln.mesenteroides subsp mesenteroides	Lb.plantarum

- ND : non déterminé

V : variable

- Profils fermentaires des souches par galerie

Pour étudier le profil fermentaire des souches sélectionnées, nous avons choisis une souche par groupe (tableau XIII) soient 6 souches : « Lc6, Lc5, Lc3 » pour les lactocoques, « Ln5 » pour les leuconostocs, « Lb11 » pour lactobacilles et « En22 » pour les enterocoques.

Parmi ces souches, 5 d'entre-elles (Lc6, Lc5, Lc3, Ln5, Lb11) ont été soumises à des micro-tests par des galeries API 50 CH constituées de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIV.

Pour l'interprétation des résultats nous nous sommes référés aux tableaux d'identification des milieux associés aux galeries ou au logiciel d'identification **apiweb TM**.

Tableau XIV : Profils fermentaires des souches par galerie API 50 CH

Sucres			Souches				
N°	Tests	Composant actifs	Lc5	Lc6	Lc 3	Ln5	Lb11
0	TMN	Témoïn	-	-	-	-	-
1	GLY	Glycérol	-	-	-	-	-
2	ERY	Erythritol	-	-	-	-	-
3	DARA	D-Arabinose	-	-	-	-	-
4	LARA	L-Arabinosr	+	-	-	+	+
5	RIB	D-Ribose	+	+	-	+	+
6	DXYL	D-Xylose	+	-	-	+	-
7	LXYL	L-Xylose	-	-	-	-	-
8	ADO	D-Adonitol	-	-	-	-	-
9	MDX	Méthyl β- D xylopyranoside	-	-	-	-	-
10	GAL	D-Galactose	+	+	+	+	+
11	GLU	D-Glucose	+	+	+	+	+
12	FRU	D-Fructose	+	+	+	+	+
13	MNE	Mannose	+	+	+	+	+
14	SBE	L-Sorbose	-	-	-	-	-
15	RHA	L-Rhamnose	-	-	-	-	-
16	DUL	Dulcitol	-	-	-	-	-
17	INO	Inositol	-	-	-	-	-
18	MAN	D-Mannitol	-	-	-	-	+
19	SOR	D-Sorbitol	-	-	-	-	+
20		MDM Méthyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	-	-
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	+	+
22	NAG	N-Acétyle Glucosamine	+	+	+	+	+
23	AMY	AMYgdaline	+	-	-	+	+
24	ARB	Arbutine	+	+	-	+	+
25	ESC	Esculine citrate de fer	+	+	-	+	+
26	SAL	Salicine	+	+	-	+	+
27	CEL	D-Cellobiose	+	+	-	+	+
28	MAL	D-Maltose	+	+	+	+	+
29	LAC	D-Lactose (origine bovine)	+	+	+	+	+
30	MEL	D-Melibiose	-	-	-	+	+
31	SAC	D-Saccharose	-	-	-	+	+
32	TRE	D-Trehalose	+	+	+	+	+
33	INU	Inuline	-	-	-	-	-
34	MLZ	D-Melezitose	-	-	-	-	+
35	RAF	D-Raffinose	-	-	-	-	-
36	AMD	Amidon	-	-	+	-	-
37	GLYG	GLYcogène	-	-	+	-	-
38	XLT	Xylitol	-	-	-	-	-
39	GEN	Gentiobiose	+	+	+	+	+
40	TUR	D-turanose 1	-	-	-	+	+
41	LYX	D-Lyxose	-	-	-	-	-
42	TAG	D-Tagatose	-	-	-	-	-
43	DFUC	D-Fucose	-	-	-	-	-
44	LFUC	L-Fucose	-	-	-	-	-
45	DARL	D-Arabitol	-	-	-	-	+
46	LARL	L-Arabitol 1,4	-	-	-	-	-
47	GNT	potassium Gluconate	-	-	-	-	-
48	2KG	Potassium 2-CétoGluconate	-	-	-	-	-
49	5KG	potassium 5-CétoGluconate	-	-	-	-	-
Pré-identification			<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> var <i>diacetyllactis</i>	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Ln.mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>Lb. Plantarum</i>

Parmi les 6 souches retenues, et faisant suite aux tests subis par les 5 souches (Lc6, Lc5, Lc3, Ln5, Lb11), nous avons utilisé la galerie API 20 STREP, pour pré-identifier la souche « En 22 » classée hypothétiquement dans le genre *Enterococcus*. La pré-identification par les tests classiques (VOS *et al.*, 2009 ; GUIRAUD, 2012) de cette souche comme appartenant probablement à l'espèce *Enterococcus durans*, semble confortée par les résultats des tests de la galerie API 20 STREP (tableau XV).

Tableau XV : Micro-tests biochimiques de la souche En 22 et profil fermentaire (Galerie API 20 STREP)

Tests	Composant actifs	Réaction/enzymes	résultats
VIP	Sodium pyruvate	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	+
HIP	Acide hippurique	hydrolyse (acide HIPpurique)	+
ESC	Esculine citrate de fer	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	+
PYRA	Acide pyroglutamique β -naphtylamide	PYRrolidonyl Arylamidase	+
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α Dgalactopyranoside	α -GALactosidase	-
β GUR	Acide naphtol-ASBIglucuronique	β -GIUcuRonidase	-
β GAL	2-naphtyl- β Dgalactopyranoside	β -GALactosidase	-
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	-
LAP	L-leucine- β naphtylamide	Leucine AminoPeptidase	+
<u>ADH</u>	l-arginine	Arginine dihydrolase	+
<u>RIB</u>	D-ribose	acidification (RIBose)	+
<u>ARA</u>	L-arabinose	acidification (Arabinose)	-
<u>MAN</u>	D-mannitol	acidification (Mannitol)	-
<u>SOR</u>	D-sorbitol	acidification (Sorbitol)	-
<u>LAC</u>	D-lactose	acidification (Lactose)	+
<u>TRE</u>	D-tréhalose	acidification (Tréhalose)	+
<u>INU</u>	Inuline	acidification (Inuline)	-
<u>RAF</u>	d-raffinose	acidification (Raffinose)	-
<u>AMD</u>	Amidon	acidification (Amidon)	+
<u>GLY</u>	Glycogène	acidification (Gly)	-
Pré-identification		<i>Enterococcus durans</i>	

Cette pré-identification est réalisée à partir de la base de données à l'aide du Catalogue Analytique ou à l'aide du logiciel d'identification **apiweb** TM.

3.2.5. Recherche des substances à activité antibactérienne

Dans cette partie nous avons étudié l'activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées contre la souche pathogène *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Nous avons également essayé de déterminer la nature de la substance antibactérienne impliquée par élimination différentielle des substances suspectées, décrites par la littérature (LABIOUI *et al.*, 2005 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010 ; MERZOUK, 2015 ; KHODJA, 2018).

3.2.5.1 Tests d'antagonisme

La technique de diffusion des puits préconisée par TAGG et MC GIVEN (1971), puis reprise et modifiée par plusieurs auteurs (SCHILLINGER et LUCKE 1989; TEN BRINK *et al.*, 1994 ; JIN *et al.*, 1996) utilisée lors de cette étude a montré ce qui suit (tableau XVI).

- la globalité des 38 souches sélectionnées a montré une activité inhibitrice contre la souche indicatrice
- cinq d'entre ces souches, appartenant au genre *Leuconostoc*, semblent présenter la meilleure activité antibactérienne (ZI entre 10 et 12 mm). BOURICHA (2011) et BELILE (2013) rapportent des valeurs de ZI, comprises entre 7 et 11mm et 10-14mm respectivement, pour des souches de *Leuconostoc* isolée à partir du lait de chamelle. MAGHNIA (2011) a trouvé dans le même contexte, des ZI comprises entre 13-15mm pour souche *Leuconostoc* isolé à partir de fromage et beurre bovine; BELARBI (2011) 16 mm pour le lait de vache et de chèvre ; HANACHI (2008) 2-7mm pour lait de chèvre. Tous les auteurs que nous venons de citer ont utilisé la même espèce que celle que nous avons utilisée à savoir *Staphylococcus aureus*.

Nous avons enregistré des zones allant de 08 à 11 mm pour *Lactobacillus plantarum*. MAMI (2013) avance des valeurs de zones d'inhibition, contre *Staphylococcus aureus* allant jusqu'à 28mm, pour une souche de la même espèce, isolée à partir lait de chèvre.

Dans le cas des souches de *Lactococcus lactis*, nous avons enregistré des ZI comprises entre 3 et 5mm. Dans le même ordre d'idée, SIBOUKEUR et SIBOUKEUR (2013) a trouvé des valeurs entre 6 - 8mm pour une souche de *Lactococcus lactis sp lactis* isolé à partir du lait de chamelle, MAGHNIA (2011) a montré des ZI comprises entre 7-12 mm de souche de *Lactococcus* isolé à partir de fromage et beurre bovine.

Pour les enterococcus, nous avons obtenu des ZI de 3 mm. Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées par LABOUI *et al.*, (2005) qui évoque des ZI de 28mm pour une souche d'enterococcus isolée à partir du jus de presse de canne à sucre contre *Staphylococcus aureus*. BELARBI (2011) a montré des zones de 2-10mm pour le genre enterococcus contre *Staphylococcus aureus*. D'autres auteurs ont montré des inhibitions exercées par des souches

d'*Enterococcus faecalis* contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella sp.* (KARAM *et al.*, 2008 ; HWANHLEM *et al.*,2011).

Tableau XVI : Effet antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 des 38 souches de bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de lait camelin collecté (méthode des puits)

Souches		Diamètre de zone d'inhibition (mm)
<i>Lc.lactis ssp lactis</i>	Lc1 et Lc2	3
	Lc7 et Lc8, Lc9	4
	Lc6	5
<i>Lc.lactis ssp lactis var diacétylactis</i>	Lc5 et Lc12	4
	Lc10 et Lc11	5
<i>Lc.lactis ssp cremoris</i>	Lc3 et Lc13	5
	Lc4 et Lc14	3
<i>En.durans</i>	En21, En22	3
	En24, En23	3
	En25, En26	3
<i>Ln. Mesenteroides ssp mesenteroides</i>	Ln1	10
	Ln2	12
	Ln3	9
	Ln4	11
	Ln5	10
<i>Lb.plantarum</i>	Lb1	9
	Lb3	10
	Lb4	11
	Lb5	10
	Lb6	10
	Lb8	10
	Lb9	8
	Lb10	9
	Lb11	11
	Lb12	11
	Lb13	9
	Lb14	9
	Lb15	9

*Nous avons sélectionnée 12 souches à raison de 2 souches pour chaque espèce retenues pour les tests ultérieurs à savoir : Lc2 et Lc6 (*Lc.lactis subsp.lactis*) ; Lc5 et Lc10 (*Lc.lactis subsp.Lactis var diacetylactis*) ; Lc3 et Lc4 (*Lc.lactis subsp cremoris*) ; En22 et En24

(*Enterococcus durans*) ; Ln3 et Ln5 (*Ln.mesenteroides subsp mesenteroides*) ; Lb6 et Lb11 (*Lb. plantarum*).

3.2.5.2. Optimisation des conditions de culture des souches productrices de substances antibactérienne

Nous avons essayé d'optimiser les conditions de culture des souches retenues pour leurs activités productrices, en faisant varier la température d'incubation et le pH du milieu de culture. Pour ce faire, nous avons commencé par une propagation de ces souches (DOUMANDJI, 2010 ; SIBOUKEUR, 2011).

3.2.5.2.1. Propagation

L'objectif de cette opération est d'augmenter la production des substances antibactérienne par l'augmentation de la masse microbienne.

Après la propagation, nous avons constaté un doublement des zones d'inhibition.

En effet, les ZI sont passé de 3-10mm sans propagation à 6-20 mm après la propagation (tableau XVII). Ceci est vraisemblablement dû à une augmentation de la production des substances antibactériennes conjointement à celle de la biomasse.

Tableau XVII : Effet antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 des souches de bactéries lactiques par la méthode de puits avant et après la propagation

Souches		Diamètre d'inhibition (mm)	
		Surnageant sans propagation	Surnageant avec propagation
<i>Lc.lactis ssp lactis</i>	Lc1	3	7
	Lc2	3	8
	Lc6	5	10
<i>Lc.lactis ssp lactis var diacétylactice</i>	Lc5	4	10
	Lc10	5	9
<i>Lc.lactis ssp cremoris</i>	Lc3	5	10
	Lc4	3	9
<i>En.durans</i>	En21	3	6
	En22	3	8
	En24	3	7
<i>Ln. Mesenteroide ssp mesenteroide</i>	Ln1	10	19
	Ln2	12	18
	Ln3	9	20
	Ln4	11	19
	Ln5	10	20
<i>Lb.plantarum</i>	Lb1	9	15
	Lb3	10	16
	Lb4	11	15
	Lb5	10	17
	Lb6	10	18
	Lb8	10	16
	Lb9	8	17
	Lb10	9	17
	Lb11	11	18
	Lb12	11	15
	Lb13	9	16
	Lb14	9	16
	Lb15	9	17

3.2.5.2.2. Optimisation de la température d'incubation de la culture

Les douze souches sélectionnées ont étéensemencées dans leurs bouillons spécifiques appropriés (MSE, MRS ou M17). Après l'étape de propagation, l'incubation est effectuée à 30 ; 37 et 45°C pendant 24 h. Après centrifugation, l'activité anti- microbienne est évaluée à partir des surnageants, par la méthode des puits, après une incubation à 37°C durant 24h.

Les résultats semblent indiquer que l'activité antibactérienne est plus importante à 30°C (ZI comprises entre 8 et 20 mm) et à 37°C (ZI comprises entre 6 et 17 mm et), chez l'ensemble des souches. Elle paraît en revanche, beaucoup plus faible à 45°C (ZI comprises entre 0 et 11 mm) (tableau XVIII , photo 11). Rappelons que nous avons montré auparavant la capacité de croissance des souches de *Lb.plantarum* , *Lc.lactis subsp.lactis var diacetylactis* et *Lc.lactis subsp cremoris* à 45°C.

Dans le même contexte, KRIER *et al.*, (1998) ont montré que la température de production des bactériocines est souvent inferieure à la température optimale de croissance.

KHODJA, 2018 a montré un pouvoir inhibiteur optimal de bactériocine produite par *Lb. brevis* (LbC3 à une température de 30°C).

LIM (2010) montrant une activité antagoniste très active à 30°C, n'a détecté aucune activité de la bactériocine produite par *L. plantarum* KC21 à 45°C d'incubation.

Pour expliquer ce phénomène MESSENS *et al.*, 2003 ont suggéré qu'à une température d'incubation élevée, des protéases sont activées en réponse au stress thermique. Aussi, JUAREZ *et al.*, (2002), ont supposé qu'à des températures supérieures à 44°C, les cellules de *Lactobacillus salivarius* CRL1328 ont été incapables de synthétiser ou sécréter des bactériocines alors que la croissance n'est pas affectée par cette température.

Tableau XVIII : Activité antibactérienne à différentes températures, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Température	Lc.lactis subsp. Lactis		Lc.lactis subsp. Lactis var Diacetylactis		Lc.lactis subsp cremoris		Enterococcus Durans		Ln.mesenteroides subsp mesenteroides		Lb.plantarum	
	Lc2	Lc6	Lc5	Lc10	Lc3	Lc4	En22	En24	Ln3	Ln5	Lb6	Lb11
30°C	8	10	10	9	10	9	8	7	20	20	18	18
37°C	6	8	8	7	7	6	6	5	17	18	16	15
45°C	0	0	5	4	3	3	0	0	0	0	11	10

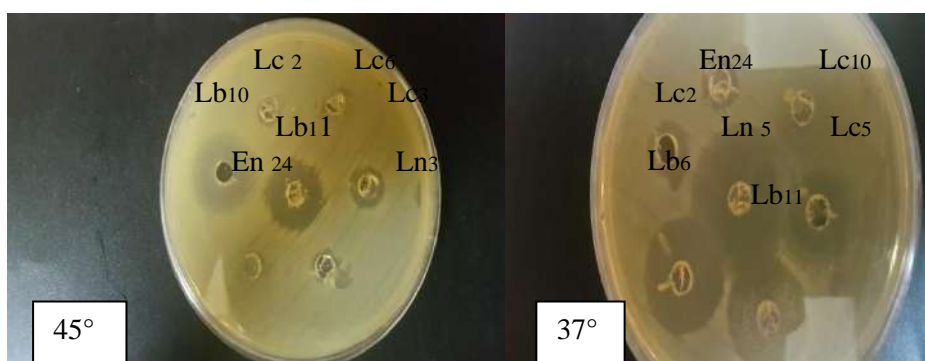


Photo 11 : Activité antibactérienne à différentes températures vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.2.5.2.3. Optimisation du pH du milieu de culture

Les douze souches ont étéensemencées dans les bouillons MSE, MRS et M17, les valeurs de pH (3, 4, 5, 6 et 7) ont été obtenues à l'aide de solutions de NaOH 1N et de HCl 1N. Après centrifugation, l'activité antibactérienne est évaluée à partir des surnageants, par la méthode des puits, après une incubation à 37°C durant 24h.

Les résultats obtenus semblent indiquer que toutes les souches donnent des ZI importantes (7-20 mm) aux pH5, pH6 et pH7 et moins importantes (4-10 mm) aux pH acides (pH 4 et pH 3) pour *Lb.plantarum* (tableau XIX) voire nulles pour les lactocoques (tableau XIX et photo 12). Ceci est dû au fait que les lactocoques ne peuvent pas croître à pH acides contrairement aux lactobacilles. Le comportement des ferments du yaourt constitue un bon exemple et conforte les résultats que nous avons enregistrés.

MERZOUK (2015) rapporte que les lactocoques développent une bonne activité antimicrobienne aux pH 5, 6, 7 et une activité moins importante à des pH 4, 3, 2.

De ce qui précède, il semblerait que l'activité antibactérienne va de paire avec la production de biomasse.

TAGG *et al.*, (1976) rapportent dans ce contexte que les conditions de culture et la composition du milieu de croissance sont très importantes pour la production de bactériocines. Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux de la croissance (MESSENS *et al.*, 2003 ; MATARAGAS *et al.*, 2003).

Tableau XIX : Activité antibactérien à différentes valeurs de pH vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

P H	<i>Lc.lactis</i> <i>subsp.</i> <i>Lactis</i>		<i>Lc.lactis</i> <i>subsp.</i> <i>Lactis var</i> <i>diacetylacti</i> <i>s</i>		<i>Lc.lactis</i> <i>subsp</i> <i>cremoris</i>		<i>Enterococcu</i> <i>s</i> <i>Durans</i>		<i>Ln.mesenteroide</i> <i>s</i> <i>subsp</i> <i>mesenteroides</i>		<i>Lb.plantarum</i> <i>m</i>	
	Lc 2	Lc 6	Lc5	Lc10	Lc 3	Lc 4	En22	En24	Ln3	Ln5	Lb6	Lb11
7	6	8	8	7	7	6	6	5	17	18	16	15
6	8	10	10	9	10	9	8	7	20	20	18	18
5	8	9	10	10	9	10	7	7	18	18	17	18
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4

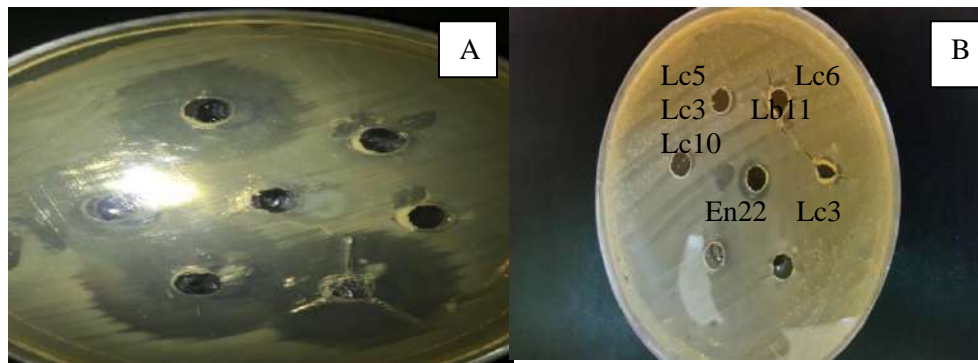


Photo 12 : Activité antibactérienne à différentes valeurs de pH vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A : par les souches de leuconostoc à pH 3, 4, 5, 6, 7

B : par les six genres à pH3

3.2.6. Nature relative des substances inhibitrices produites par la flore lactique

L'activité anti-bactérienne peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les acides organiques, la lysogénie due aux attaques par des bactériophages, les bactériocines...etc.

Dans le but de déterminer la nature relative de l'agent inhibiteur, nous avons procédé par étape séquentielle en levant à chaque fois l'inhibition de l'agent soupçonné.

3.2.6.1. Levée de l'inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Pour lever l'inhibition de H_2O_2 , on doit utiliser une solution de catalase. Cela justifie le choix de la souche cible, « *Staphylococcus aureus* » à catalase positive.

Nous avons testé l'activité microbienne des 12 souches préalablement sélectionnées utilisées en culture mixte avec une suspension de la souche cible référencée staphylococcus. Les cultures bactériennes mixtes (bouillons, MRS, M17 et MSE) sont incubées à 37 °C pendant 24h. Après centrifugation, les surnageants sont soumis à la méthode de diffusion en puits en doubles couches.

Tous les isolats ont montré des ZI importantes (tableau XX, et photo 13 B). Cette constatation expérimentale laisse supposer que la plus grande part de l'effet antibactérien revient à des substances produites par la flore lactique autre que le peroxyde d'hydrogène dont l'effet est levé par la catalase de la souche indicatrice (*Staphylococcus aureus* ATCC25923).

Cette constatation rapportée par HENG *et al.*, (2007) in SIBOUKEUR (2011) a été vérifiée un peu plus tard (SIBOUKEUR, 2011). D'après ces auteurs, la production de bactériocines peut croître quand les cellules productrices subissent un stress nutritionnel ou environnemental par culture mixte avec leur antagoniste (souche de *Staphylococcus aureus*). Dans le même ordre d'idées, LABOUI *et al.*, (2005) avait indiqué que l'élimination de l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'oxygène favoriserait plutôt l'activité des substances antibactériennes.

En outre, de nombreux auteurs rapportent que la production de H₂O₂ par les bactéries lactiques était rare et se fait le plus souvent en faible concentration, pour ne pas provoquer l'auto-inhibition de la souche productrice (JUILLARD *et al.*, 1987 ; LABIOUI *et al.*, 2005 ; GONG *et al.*, 2010).

3.2.6.2. Levée de l'inhibition due aux acides organiques

Pour évaluer l'effet inhibiteur potentiel des acides organiques, nous avons réajuster le pH des milieux de culture (MRS, M17 et MSE) à 6.5 par addition de NaOH 1N. Des milieux de culture n'ayant pas subi de réajustement de pH nous ont servi de contrôle positif.

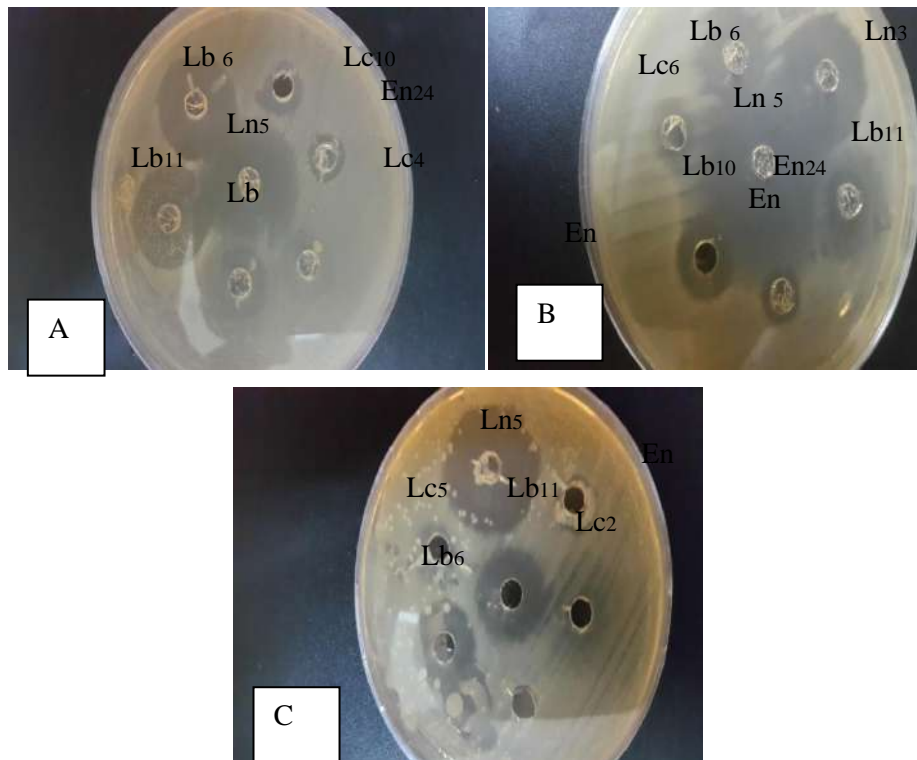
Nous avons alors constaté une diminution des ZI dans les milieux dont les pH ont été neutralisés. Les ZI produites par les leuconostoc et les lactobacillus semblent plus importantes (15 et 13 mm respectivement) par rapport à celles des lactococcus et des enterococcus (de 3 à 6 mm respectivement) (tableau XX).

Ces résultats sont confortés par ceux de plusieurs chercheurs qui mentionnent la diminution des ZI après neutralisation des milieux à pH 6,5 ou 7. La part des acides organiques dans le système antibactérien du lait n'est pas négligeable.

Rappelons que les souches hétérofermentaires strictes produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique ou de l'éthanol plus du CO₂, que les hétérofermentaires facultatifs produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique et que les homofermentaires produisent de l'acide lactiques.

Tableau XX : Activité antibactérienne après la levée de l'effet de H₂O₂ et celles des acides organiques

Souches		Diamètre d'inhibition (mm)		
		Surnageant avec propagation	Surnageant additionné de staphylococcus	Surnageant neutralisé par 1N de NaOH
Lc.lactis ssp lactis	Lc2	8	9	6
	Lc6	10	12	5
Lc.lactis ssp lactis var diacétylactice	Lc5	10	12	4
	Lc10	9	11	5
Lc.lactis ssp cremoris	Lc3	10	12	6
	Lc4	9	12	6
En.durans	En22	8	10	3
	En24	7	10	3
Ln. Mesenteroide ssp mesenteroide	Ln3	20	21	15
	Ln5	20	22	16
Lb.plantarum	Lb6	18	20	12
	Lb11	18	20	13



Photos 13 : Activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A : Après propagation

B : levée de l'effet de H₂O₂

C : levée de l'effet des acides organiques

3.2.6.3. Inhibition éventuelle due à une attaque phagique de la souche cible

Nous avons réalisé cette partie pour vérifier une présence éventuelle de phages susceptibles de provoquer un effet anti-staphylocoques. Nous avons pris un fragment de la zone d'inhibition que nous avons traité du chloroforme (pour éliminer les bactéries résiduelles) (RAVAT, 2015). Nous avons prélevé 300µl de milieu que nous avons ajouté à 7.5 ml de gélose molle contenant la souche indicatrice (*Staphylococcus aureus*).

L'obtention d'un tapis bactérien de Staphylocoques, indique l'absence totale de phages dans les douze souches isolées.

Nous pouvons donc conclure que l'activité antibactérienne observée n'a pas pour origine une attaque phagique de la souche indicatrice.

3.2.6.4. Inhibition due aux bactériocines

Les bactériocines sont des peptides extracellulaires, thermostables, synthétisés par voie ribosomique. Elles sont douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre les espèces proches (spectre étroit) ou d'autres genres (spectre large) pour lesquels la cellule productrice dispose d'un mécanisme d'immunité spécifique (COTTER *et al.*, 2005).

La sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal pour leur identification. Le traitement des surnageants des cultures des 12 souches lactiques sélectionnées par les deux enzymes protéolytiques : la trypsine et l' α -chymotrypsine montre une absence totale des ZI pour les surnageant traité par les enzymes et des zones bien distingue pour les surnageants non soumis à l'action des protéases (photo 14). Ce résultat est de nature à suggérer que les substances responsables de l'effet antibactériens sont de nature protéique et sont donc des bactériocines. Ce résultat est valable pour les 4 genres de bactéries lactiques étudiées.

De nombreux auteurs rapportent la sécrétion de bactériocines par ces genres. Dans ce contexte, BENHAMOUCHE *et al.*,(2012) et MERZOUK (2015) ayant isolé une souche de *Lactococcus lactis* à partir de lait cru de chèvre ont montré que la substance antibactérienne sécrétée était de nature protéique, suite à l'observation de l'action protéolytique de la trypsine et de la chymotrypsine. SIBOUKEUR (2011) a isolé une bactériocine (type nisine) produite (dans le surnageant) par une souche de *Lactococcus lactis* isolée à partir du lait camelin collectée dans la région d'Ouargla. MAMI (2007) a mis en évidence la sensibilité à la trypsine et à la chymotrypsine, de substance antibactérienne secrétée par une souche de *Lb. plantarum* isolée à partir du lait de chèvre. DOUMANDJI (2010) a indiqué la sensibilité d'une substance antimicrobienne produite par une souche de *Lb. acidophilus* aux enzymes protéolytiques.

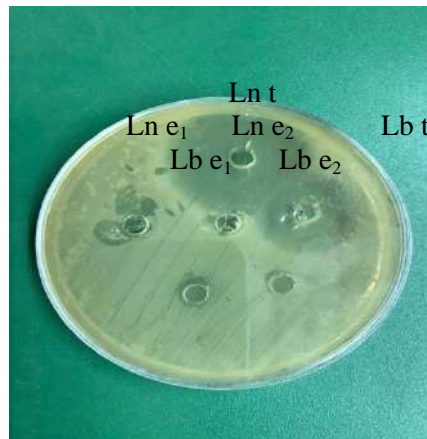


Photo 14 : Zones d'inhibition créés par des surnageants des souches de leuconostoc et lactobacilles après traitement par des enzymes
t: témoin e₁ : trypsine e₂ : α -chymotrypsine

3.2.6.4.1 Nature chimique des bactériocine

Pour but d'étudier les caractéristiques physico-chimiques des substances contenues dans le surnageant des cultures des souches isolées, des tests d'antagonismes à différentes températures et à différents pH sont réalisés. Nous avons sélectionné à cet effet, 6 souches pour leur performances à savoir :

Lc6 (*Lc.lactis subsp.lactis*), Lc5(*Lc.lactis subsp.Lactis var diacetylactis*), Lc3 (*Lc.lactis subsp cremoris*), En22 (*Enterococcus durans*), Ln5 (*Ln.mesenteroides subsp mesenteroides*), Lb11 (*Lb. plantarum*).

- **Effet des traitements thermiques**

Les six surnageants des souches sélectionnées sont soumis à des traitements thermiques de 60°C, 70°C, 80°C ,90°C pendant 10 minutes et à une série d'autoclavage à 100 °C/30min et 121 °C/15 min.

Les résultats montrent des ZI comparables à celles du témoin (surnageant non traité par la chaleur) pour les six souches sélectionnées (photo et tableau XXI). Ces résultats sont de nature à suggérer que ces substances antibactérienne produites par les souches de Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc et Lactobacillus camelines sont des bactériocines du fait de leur thermostabilité et de leur thermorésistance..

Dans ce contexte, quelques auteurs ont montré la thermorésistance des bactériocines ou substance antimicrobienne, (BOURICHA, 2011) L'auteur a montré la résistance d'une substance antimicrobienne sécrété par leuconostoc cameline à 100°C. Dans le même ordre d'idée, LABOUI *et al.*, (2005) a montré la thermorésistance des bactériocines produites par une souche de streptococcus.

Tableau XXI : spectre d'activité des substances antibactérienne (bactériocine) pour les six souches criblé (plus performante) après traitement thermique, Zone d'inhibition exprimée en mm

Traitement thermique	Lc3	Lc5	Lc6	En22	Ln5	Lb11
Témoin (non traité par la chaleur)	6	4	5	3	15	13
60°C/10min	6	4	4	4	14	14
70°C/10min	5	5	4	3	13	14
80°C/10min	6	4	5	4	14	15
90°C/10min	6	5	4	4	14	14
100°C/30min	5	3	3	3	12	12
121°C/15min	4	3	3	3	12	12

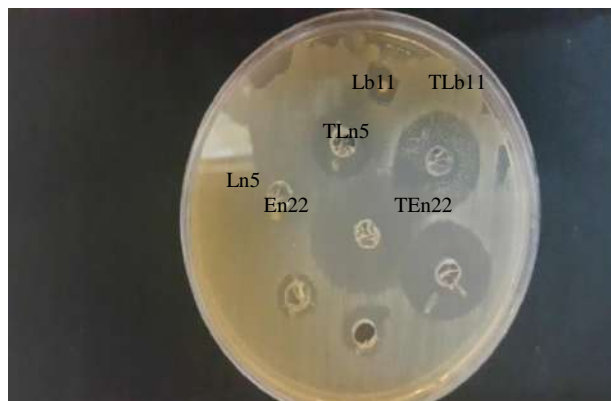


Photo 15: Thermorésistance des Lb11 et Ln5, En22 à 121°C/15 min. en comparaison avec le témoin non traité

- **Effet du pH**

Une gamme de pH allant de 2 à 10 est réalisée par addition de HCL 1N ou NaOH 1N sur les surnageants de culture des 6 souches sélectionnées. Des ZI comparables à celles du témoin (surnageant non traité) pour les six souches (photo 16 et tableau XXII); ceci indique la stabilité de cette substance protéique à pH acide et basique. Ces résultats sont en accord comparable ou similaire avec ceux présentés au Maroc, par KHAY *et al.*, (2011) qui rapportent la stabilité des substances antibactérienne de nature protéique isolées à partir du lait camelin des espèces *Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, un *Enterococcus faecium*, un *Lactococcus cremoris* et un *Enterococcus avium* sur une large gamme de pH (2-10).

Tableau XXII : Spectre d'activité des substances antibactérienne (bactériocine) pour les six souches criblées (plus performante) à différentes valeurs de pH, Zone d'inhibition exprimée en mm

Ph	Lc3	Lc5	Lc6	En22	Ln5	Lb11
2	5	3	5	3	14	13
3	5	3	5	3	14	13
4	6	4	6	4	15	14
5	6	4	5	3	14	13
6	7	5	6	4	15	14
7	6	4	6	4	13	14
8	5	5	5	3	14	13
9	5	4	5	3	13	13
10	5	3	4	3	13	12

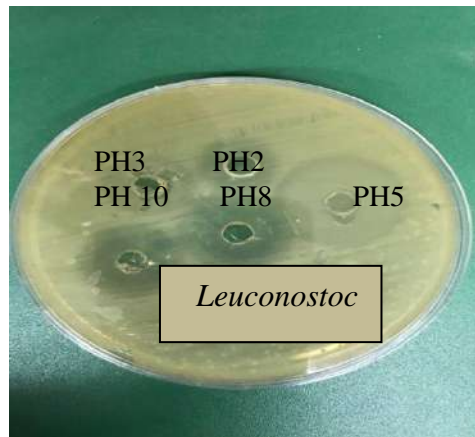


Photo 16 : Traitement à différentes valeurs de pH des surnageants de culture des souches de *Leuconostoc*

3.2.7 Cinétique de croissance des souches lactiques isolées

L'estimation de la croissance bactérienne en fonction du temps repose sur deux critères : la masse cellulaire et le nombre de bactéries qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. L'interprétation des courbes de croissance obtenues par spectrophotométrie n'est cependant pas facile pour deux raisons : la densité optique permet de mesurer la biomasse et non directement sa concentration en cellules viables. En plus, cette valeur n'est mesurable que lorsque la concentration de la culture atteint un seuil entre 10^5 - 10^7 cellules par ml en fonction du microorganisme étudié (AUGUSTIN, 2005).

BERGERE et LACOURT (1968) indiquent que lorsque l'on désire effectuer des mesures d'opacimétrie, dans un large intervalle de densité optique, il est nécessaire d'établir au préalable, la relation qui existe entre la densité optique et la concentration en cellules.

Dans la présente étude, nous avons mesuré la masse cellulaire selon la densité optique et tracé la courbe de croissance de la bactérie.

La détermination de la cinétique bactérienne est effectuée sur milieu de culture liquide par mesure de la densité optique d'une suspension bactérienne, inoculée et incubée à une température de 37°C pendant 24-48h à une longueur d'onde de 600nm.

La cinétique de croissance cellulaire dans les milieux MRS et M17 inoculés par les différentes souches (Lb11, Ln5, Lc3, Lc5, Lc6, En22) est illustrée dans la (figure16).

Bien que les échantillons de lait soient inoculés à raison de 1% pour toutes les souches lactiques, nous avons remarqué que les points initiaux à T0 ne coïncident pas pour toutes les souches.

Ceci pourrait être justifié par la variabilité de la texture et la finesse des granules des souches lactiques. Cette variabilité leur conférerait des propriétés optiques différentes.

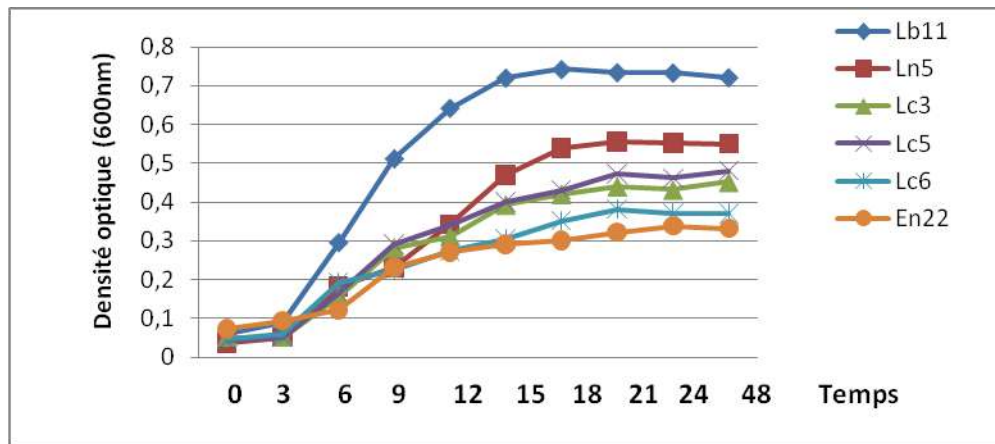


Figure 16 : Cinétique de croissance des souches lactiques isolées

Il ressort de la figure 16 qu'au cours du temps, il y'a augmentation de la biomasse des différents souches étudiés. Nous avons suivi l'évolution de la densité optique toutes les trois heures, pendant 24 heures et après 48 heures.

Nous avons alors constaté ce qui suit :

- ❖ la croissance bactérienne, pour les six souches lactiques dans les milieux MRS et M17 se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue ;
- ❖ la phase de latence dure 3 heures pour les Lb11, Ln5, Lc5, Lc6, Lc3 et presque 6 heures pour En22. Elle correspond à une adaptation des cellules inoculées à leur nouvel environnement. La durée de cette phase dépend du travail (biosynthèses, adaptations métaboliques) que les cellules doivent accomplir avant d'entrer en division (ROBINSON *et al.*, 1998). Cette conception rejoint l'hypothèse selon laquelle la croissance des populations bactériennes serait contrôlée par une entité qui doit atteindre une concentration cellulaire critique avant que la division cellulaire ne se produise (COOPER, 1991 ; BARANYI *et al.*, 1993 ; BARANYI et ROBERTS, 1994 ; HILLS et WRIGHT, 1994) ;
- ❖ la phase exponentielle de la croissance débute après 3h pour les souches Lb11, Ln5, Lc5, Lc6 et Lc3) et après 6 heures pour la souche En22 ; les Lb11 et Ln5 continuent à croître pour atteindre la fin de la phase exponentielle après 18 h et 21 h avec une croissance maximale (DO : 0,743 et 0,556 respectivement) ; les souches Lc3, Lc5 et

Lc6 atteignent une DO maximale (0.441, 0.472 et 0.382 respectivement) après 21 h d'incubation ; une croissance maximale (DO : 0.339) de En22 est constatée après 24 h d'incubation.

3.2.8. Effet des surnageant de cultures des souches tests sur la croissance de la souche cible

L'ajout de surnageant de cultures des souches lactiques isolées à la culture de la souche cible (après 4 heures d'incubation de celle-ci) a entraîné une diminution de la croissance de cette dernière (figure 17 et 18).

Les travaux de BHUNI *et al.* (1991), O'SULLIVAN *et al.* (2002) montrent aussi une augmentation de la densité optique puis une diminution de celle-ci après l'ajout du surnageant. RODRIGUEZ *et al.* (2000) montrent aussi qu'après quelques heures d'incubation, la croissance de *Staphylococcus aureus* diminue après l'addition du surnageant de *Lactococcus lactis*.

Cette constatation expérimentale due probablement à l'action des acides organiques (lactique et acétique) et des bactériocines est plus nette dans le cas des surnageants des cultures des leuconostocs et des lactobacillus.

- L'étude statistique des résultats obtenus a été réalisée par le test χ^2 (prononcé ki 2/chi2) à l'aide du logiciel de statistique XLSTAT, nous ont permis de déterminer qu'il n'y a pas une différence significative p-value > 0.05 (Annexe 08) entre l'effet exercé par des substances antibactérienne (surnageant non neutralisé) de six souches (Ln5, Lb11, Lc3, Lc5, Lc6, En22) sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, par contre l'effet exercé par ces six substances antimicrobiennes (surnageant neutralisé = bactériocine) est significativement différent p-value < 0.05 (Annexe 09)

Le test χ^2 ont permis aussi de comparé l'effet des substances antibactérienne et la bactériocine produite par la même souche sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nous avons montré une différence significative entre les substances antibactérienne et la bactériocine produites par les souches (Ln5 et Lc5) et une différence non significative pour (Lb11, Lc3, Lc6, En22) (Annexe 10).

La matrice de corrélation (ANNEXE 11), nous a permis de constaté que les substances antimicrobienne produite par la souche leuconostoc exhibent une activité antibactérienne le plus prononcée envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, malgré que la croissance bactérienne est plus importante chez les lactobacilles (Figure 16). PARENTE *et al.*, 1999)

indiquent que l'optimisation de la croissance ne provoque pas nécessairement une optimisation de la production de bactériocines. Il a même suggéré que des conditions de croissance défavorables permettraient de stimuler leur production (VERLUYTEN *et al.*, 2004).

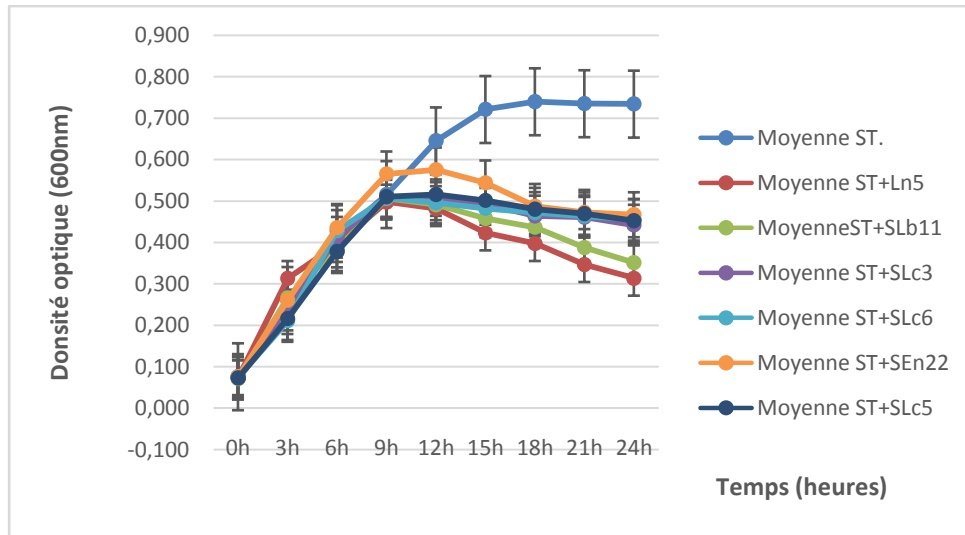


Figure 17 : Effet des substances antibactérienne sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

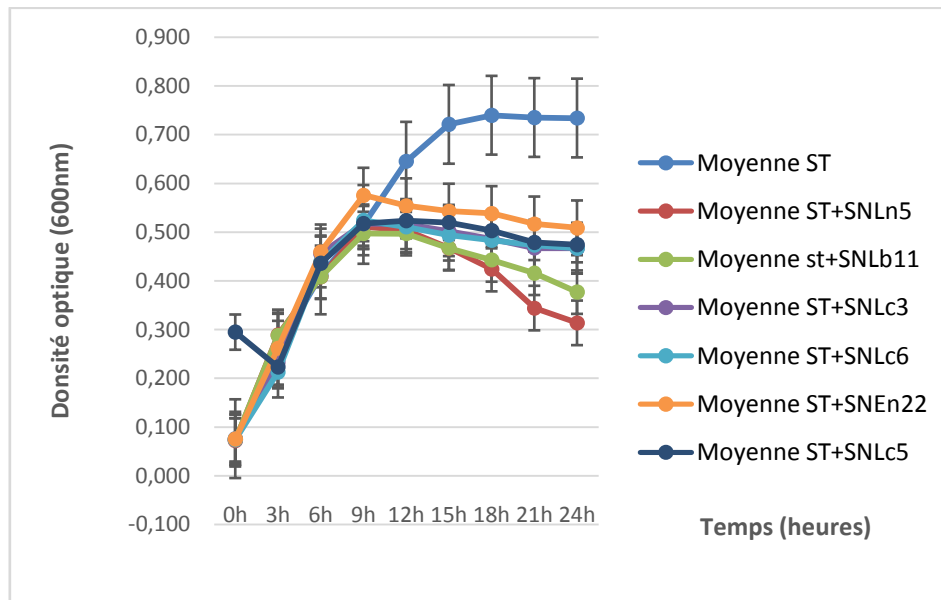


Figure 18 : Effet des bactériocines sur la souche *Staphylococcus*

Conclusion

Conclusion

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les nomades où sa richesse en vitamine C (dont la quantité se trouvant dans litre de lait couvre 40% des besoins) constitue un apport nutritionnel important dans les régions arides où les fruits et les végétaux contenant cette vitamine sont rares. Il est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti-infectieuse, anti-cancéreuse, anti-diabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents.

Dans la présente étude nous avons tenté d'apporter une modeste contribution à une meilleure connaissance de l'effet de système autoépuration de ce lait et nous avons ciblé l'analyse physico-chimique, biochimique et microbiologique.

L'analyse physico-chimique a montré que le lait camelin, collecté dans plusieurs régions du sud de notre pays, présente globalement une composition très similaire à celle du lait bovin, particulièrement en ce qui concerne les teneurs en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose). Il est important de signaler à ce niveau que malgré la pauvreté de l'alimentation qu'il reçoit, le dromadaire produit un lait très riche, ayant un taux de vitamine C élevé, estimé en moyenne à $45.48\text{g/l} \pm 0.64$

Le suivi de l'évolution du pH et de l'acidité titrable, a permis de montrer que le lait cru peut se conserver plus de deux (2) jours à la température ambiante (25°C) et plus de 4 jours à 4°C. Le suivi de l'évolution de la flore susceptible de contaminer le lait camelin à savoir la flore halotolérante, les coliformes et les entérobactéries a montré l'action auto-épuratrice du lait camelin dont la durée peut s'étendre jusqu'au douzième jour (J0+11) d'entreposage contrairement aux laits d'autres espèces laitières pour lesquelles le phénomène d'autoépuration ne dure que 6 heures après la traite. Les résultats enregistrés lors de la présente étude sont de nature à suggérer que l'effet de la réfrigération permet de renforcer l'action inhibitrice du système protecteur de ce lait par un effet de synergie. Parallèlement, il semblerait que la pasteurisation quelque soit son intensité et sa durée (couple température – temps) est très efficace contre cette flore de contamination. Il faut toutefois éviter le recours à la pasteurisation dans le cas où ce bioproduit serait destiné à la fabrication de lait fermenté (Iben). Ce qui représente un intérêt économique non négligeable.

Dans la présente étude nous nous sommes intéressé aussi à l'isolement et l'identification des souches appartenant au genre *Lactococcus* et *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc* à partir du lait cru de chamelle (*Camelus dromedarius*) de la région d' Ouargla et à mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches lactiques identifiées vis-à-vis de souches halotolérantes pathogènes susceptibles de contaminer ce lait du fait de sa salinité prononcée

et des conditions de traite souvent non conformes. La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est utilisée comme souche cible dans les tests d'antagonisme utilisés dans ce travail.

Dans le but d'optimiser les conditions de culture des souches d'intérêt retenues pour leurs activités productrices de substances antibactériennes, nous avons fait varier la température d'incubation et le pH du milieu de culture. Pour ce faire, nous avons commencé par une propagation de ces souches afin d'augmenter la production des substances antimicrobiennes par l'augmentation de la masse microbienne. Après la propagation, nous avons constaté un doublement des zones d'inhibition.

Les résultats semblent indiquer que les températures et pH optimaux de production des substances antibactériennes sont souvent inférieurs à ceux de la croissance bactérienne. Des tests d'antagonismes avec les surnageants de douze souches sélectionnées contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont réalisés. Les résultats ont révélés que les meilleures activités antibactérienne (ZI) obtenues par les espèces *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*.

Parmi les substances antibactériennes produites par les souches lactiques isolées dans cette étude, des substances de nature protéique et thermostable, gardant leur effet sur une large gamme de pH. Ces caractéristiques offrent une protection utile contre une éventuelle contamination de lait avec des micro-organismes pathogènes ou de décomposition. Ces composés antibactériens peuvent être utilisés dans les aliments, car elles sont stables à des pH et températures choisies sur la base de leurs niveaux habituels dans les aliments et les opérations de traitement.

La cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en présence et en absence de la substance antibactérienne neutralisée (bactériocine) et non neutralisé produite par les souches lactiques a montré que la biomasse bactérienne de la souche cible a diminué progressivement après l'ajout des bactériocines.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce travail tels que :

- Isolement et purification et identification des bactériocines par des méthodes chromatographiques (HPLC, FPLC ... etc).
- Caractérisation des gènes impliqués dans la production de ces substances active
- Réalisé des essais de développement d'un levain spécifique contenant des souches de *Leuconostoc mesenteroides* et de *Lactobacillus plantarum* d'origine cameline dans le but de prolonger la durée de conservation des produits laitiers et d'autres produits

alimentaires tels que les produits carnés et d'assurer ainsi une meilleure qualité sanitaire

Références bibliographiques

A

ABDEIRRAHMANE-JONES N., (1994).La pasteurisation du lait de chamelle une expérience en Mauritanie. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

ABIDI K., (2001).Contribution à la connaissance du lait camelin : étude de l'évolution de la microflore du lait entreposé à la température ambiante et à 4 °C. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Agronomie Saharienne, Université de Ouargla.

ABU-LEHIA I.H., (1987).Lactation of camels and composition of milk in Kenya. *Milchwissenschaft*, 42, 368-371

ABU-LEHIA I.H., (1994). Recombined camel's powder. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

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.*, **81**, 354-361.

ACHEMCHAM F. et ABRINI J. (1997). Production de bacteriocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of applied Microbiology*. 70 :66-669.

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

ALLISON G. E., FREMAUX C., KLAENHAMMER T.R. (1994). Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of Iwo peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, 176: 2235-2241

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. Pages 13 à 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.*, **22**, 243-252.

ALLOUI-LOMBARKIA O., GHENNAM E-H., BACHA A., ABEDEDDAIM M. (2007). Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Renc. Rech. Ruminants*, 14, 108.

AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. et CHEVALLIER I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *FContr.17* : 454–461

ANANOU S., MUNOZ A., MARTINEZ-BUENO M., GONZALEZ-TELLO P., GALVEZ A., MAQUEDZ M., VALDIVIA E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol* 27 : 58-63.

ARQUES J L., RODRIGUE E., NUNEZ M., MEDINA M. (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *F Contr. 22* : 457- 461.

ARROUM S., ZMOULI K., GADDOUR A., FGUIRI I., AYEB N., KHORCHANI T. (2015). Etude comparative des caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de lait camelin en fonction du mode d'élevage. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, JS-INAT(4)*, 847-850.

ATARHOUCHE T., BENDAHDAN N., HAMERS –CASTERMAN C., HAMERS R., MUYLDERMANS S. (1997). cDNA sequence coding for the constant region of the dromedary gamma3 heavy Chain antibody. *J. Camel Pract. Res*, 4, p. 177-182.

ATTIA H., KHEROUATOU N., NASRI M., KHORCHANI T. (2000). Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, **80**, 503-515.

AUGUSTIN J., C. (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Mémoire Pour l'obtention de l'habilitation a dirigé des recherches, Sciences de la vie. L'Université Paris XII Val de Marne.

AXELSSON L.T., CHUNG T.C., DOBROGOSZ W.J., LINDGREN S.E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.

AXELSSON L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria.* Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Dekker. p. 1-72.

AXELSSON L.(2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Ed., Marcel Dekker, pp: 1-66

B

BA DIAO M. (2000) : La qualité du lait et produits laitiers. Communication à l'atelier de restitution de l'étude sur la filière lait au Sénégal. GRET / ENDA-GRAF Dakar.

BARANYI J., ROBERTS T.A., MC CLURE P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43-59.

BARANYI J., ROBERTS T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277-294.

BARBOSA M.S., TODORV S.D., JURKIEWICZ C.H et FRANCOB.D.G.M (2015). Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 47 147-153

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.*, **47**, 838-840.

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

BEERENS H., LUQUET F. M. (1987) : Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris

BEG O.U., BAHR-LINDSTRÖM H.V., ZAIDI Z.H. and JÖRNVALL H. (1987). Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Febbs L.*, **216**, 270-274.

BEKHOUCHE F. et BOULEHROUF A. (2005). Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de constantine. *Sciences & Technologie C – N°23*, pp. 38-45.

BEKHOUCHE F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. These de doctorat d'état, en Microbiologie et Enzymologie, Option : Genie alimentaire, Universite de Mentouri Constantine.

BELARBI F. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de Magistère Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle, Université d'ORAN Es Senia

BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. (1994). Composition minérale du lait de chamelledu sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie

BENHAMOUCHE N., TALHI M. KIHAL M. URDACI M. (2012). Caractérisation phénotypique et moléculaire des bactéries anti-Listeria du lait algérien. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 60:S116-S117

BERGERE J. L. et LACOURT A. (1968). Production massive de cellules de streptocoques lactiques. 1. méthodes générales d'étude et facteurs de la croissance de « streptococcus lactis » souches c10, *Le Lait*, INRA Editions, 1968, 48 (471_472), hal-00928446, pp.1-11.

BERTRAND F. (1988). le fromage grand œuvre des microbes .revue générale de froid, 78,519-527.

BHUNIA A. K., JOHNSON M. C., RAY B. et KALCHAYANAND N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. Journal of Applied Bacteriology, Volume 70, Issue 1, P. 25-33

BJORKROTH J. et HOLZAPFEL W.H. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : The Prokaryotes. Vol 4. Springer, pp 267-319.

BONFOH B., SCHELING E., VIAS G.F., KAMIL H., FAYE B., FARAH Z. et ZINSSTAG J. (2003) : Les facteurs de valorisation du lait de chamelle dans les pays du Sahel. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.

BOTTAZZI V. (1988). An introduction to rod-shaped lactic bacteria, *Biochimie*, 70: 303-315

BOUDJENAH HAROUN S. (2012) .Aptitude à transformation de lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires .Thèse de doctorat en science Biologique, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

BOUDJENAH HAROUN S., LALEYE S., SNOUSSI C., MOULTI-MALTI F., SI AHMED S. et MATI A. (2012). Coagulation of Camel Milk using Dromedary Gastric Enzymes as a Substitute of the Commercial Rennet. American Journal of Food Technology, Volume 7 (7): 409-419,

BOUIX M. et LEVEAU J. Y. (1988). Les microflores responsables des transfonnations ; In : techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA : le contrôle microbiologique. Vol. III, Tec. et Doc., Paris

BOUMHIRA A.Z., MAMI A., HAMED I. A.R., H ENNI J.E et KIHAL M. (2011). Identification and characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and camel milk Collected in Algeria.J. Pure. APPL.Microbiol.Vol.5(2): 553-566.

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

BROGDEN K.A. (2005).Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature reviews*, 3, 238-250.

BROTZ H. JOSTEN M., WIEDEMANN I., SCHNEIDER U., GOTZ F., BIERBAUM G., SAHL H.G. (1998).Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and lantibiotics. *Mol microbiol*,30 , 317-327.

C

CAPILICE E., FITZGERALD G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.

CAROLE L. VIGNOLA, (2002) : Science et technologie du lait. Fondation de technologie laitière du Québec, Presses inter Polytechnique, Dairy processing ,600 pages.

CARR F.J., CHILL D. et MAIDA N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.

CASABURI A, DI MARTINO V, FERRANTI P, PICARIELLO L, et VILLANI F. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control* 59: 31-45.

CENATIEMPO Y, J., BERJEAUD M., BIET F. et FREMAUX C. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le Lait* 76: 169-177.

CHARTERIS W.P., KELLY P.M., MORELLI i L. et COLLIS J.K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64, 2007- 2014.

CHEHMA A. (2005). Etude floristique et nutritive des parcours camelins du sahara septentrional algérien: cas des régions d'Ouargla et Ghardaïa. Thèse de Doctorat en Biologie Appliquée, Université B. Mokhtar- Annaba.

CHETHOUNA F. (2011). Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologiques de lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru, Mémoire de magister en biologie .option microbiologie appliquée.Université Kasdi Merbah Ouargla.102p

CHETHOUNA F., SIBOUKEUR O., BOUDJENAH HAROUN S. (2018). Evolution of the contamination flora of camel milk collected locally during spontaneous fermentation, Vol. 74 | No. 4/1, International Journal of Sciences and Research ponte, florence Italy.

CHEVREUX S., SOLARI P.L., ROUDEAU S., DEVES G., ALLIOT I., TESTEMALE D., HAZEMANN J.L. et ORTEGA R. (2009). EXAFS analysis of a human Cu, Zn SOD isoform focused using nondenaturing gel electrophoresis, Journal of Physics IV, 190, sous presse.

CHISSOV V.I., YAKUBOVSKAYA R.I. (1995). Médicament pour soigner le rhumatoïde arthrite, Brevet° RU 2088238,

CHOI H. J., CHEIGH C. I., KIM S. B. ET PYUN Y. R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. Journal of Applied Microbiology 85, 88, 563-571.

CHUNG T. C., AXELSSO L., LINDGREN S. E., et DOBROGOSZ W. J. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. Microbial ecology in health and disease, 2, 137–144.

CLAISSE O. et LONVAUD – FUNEL A. (2000). Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food microbiology*, **17**, 513–519.

COLLINS M.D., FARROW J.A.E., PHILLIPS B.A., FERUSU S. et JONES D., (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-

negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.

COLLINS M. D., WILLIAMS A. M. et WALLBANKS S. (1990). The phylogeny of *Aérococcus* and *Pediococcus* as determined by 16sr RNA sequence analysis: description of *Tétragenococcus*, gen. nov., EFMS. *Microbiol., Lett.*, 70: 255-262

COLLINS M. D., SAMELIS J., METAXOPOULOS J., WALLBANKS S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595–603

CONTI A., GODOVAC-ZIMMERMAN J., NAPOLITANO L. et LIBERATORI J., (1985). Identification and characterization of two α -Lactalbumin from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*), *Milchwissenschaft*, **40**, 673-675.

COOPER, S. (1991). *Bacterial Growth and Division*. Academic Press, London

COTTER P. D., HILL C et ROSS R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (10) : 777-788

COTTER P, ROSS P. et HILL C. (2013). Bacteriocin - aviable alternative to antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 11 (2) : 95-105.

D

DAESCHEL M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.

DAOUDI A. (2006). Qualité d'un fromagr local à base du lait de chèvre. Mémoire de magistère en biologie, option sciences alimentaires, Université Hassiba Ben Bouali Chlef, 187 p.

DEBUYSER M. L. (1991). Méthodes d'évaluation des microflores à incidencesanitaire: les staphylocoques coagulase +. In : techniques d'analyse et contrôle dans les IAA, Le contrôle microbiologique, Tec. & Doc., Vol.3 : 2^{ème} Ed, Lavoisier. Paris

DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M.C., JANSSENS D.(1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica. pp 25-70

DENIS R., (2001). Productio et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus actis ssp lactis* MJCIS, Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences, Université Laval, Canada.132p

DESMAZEAUD, M.J et DE ROISSART, H. (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques. p. 169-207, *Bactéries Lactiques*, vol. 23. H. De Roissart et F.M. Luquet, Loriga

DESMAZEAUD M. (1998). Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherche laitière, INRA Jouy-en-Josas. France.

DEVOYOD J.J. et POUILLAIN F. (1988). Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280

DIARRA M.S., PETITCLERC D., LACASSE P. (2002). Effect of Lactoferrin in Combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis *J. of Dairy Sci.* 85,1141-1149

DICKS L. M. T., DELLAGLIO F., COLLINS M. D(1995). "Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* corrig. gen. nov., comb. nov". "International Journal of Systematic Bacteriology". 1995. Volume 445. P. 395-397

DIENG M, (2001). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur les marchés dakarois. Thèse : Méd. Vét, Dakar, 10

DJAMAN A.G. (2018). Caractérisation physicochimique, microbiologique et immunochimique des laits camelin et bovin d'Algérie. Activités antioxydante et antitoxique de la fermentation, Thèse de doctorat en science Biologique, Option Biochimie immunologie, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, 176p.

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

DOUMANDJI A. (2008). Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolée. Thèse de doctorat en sciences, option sciences alimentaires, institut national agronomique, 129p.

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

DRICI H., GILBERT C., KIHAL M. et ATLAN D. (2009). Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from domedary's milk. J of App Microb ISSN 1364-5072

DRICI H. (2010). Analyses biochimique, génétique et moléculaires de lactocoque protéolytique issu du lait de chamelle d'Algerie. Thèse de doctorat en sciences, option Biotechnologie, Université d'Oran.

DRIDER D, FIMLAND G., HECHARD Y., MC MULLEN L.M. et PREVOST H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol R* 70: 564-58. vol 16. pp28-61.

DORTU C. et THONART P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(1), 143-154

DUHAIMAN A.S (1988). Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Comp. Biochem. Phys.*, **91**, 793-796.

E

ECKER K.F. (1992). Bacteriocin and food applications. *Dairy Food Environ Sanit* 12: 204-209

EL AGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. et ASSAF R., (1996). Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk *Int Dairy J.*, 6, 129-145.

EL AGAMY E.I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors : a comparison with cow's and buffalo. *Food Chem.*, **68**, 227-232.

EL AMIN F. M. et WILCOX J. (1992). Composition of Majaheim camels. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3155-3157.

ELLOUZE S. et KAMOUN M. (1989): Evolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de lactation. *Options Méd.*, 6, 307-323.

EI SAYED I., EL AGAMY E.SA., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. et ASSAF R. (1992). Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy Res.*, **59** 169-175

ENDO A, OKADA S. (2006). *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting *Oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:2345–2348

ENNAHAR S., ASSOBEI O. et HASSELMANN C. (1998a).Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. food protection* 2: 186-91

ENNAHAR S. AOUDE-WERNER D., ASSOBEI O. et HASSELMANN C. (1998b). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE81 isolated from cheese.» *J Appl Microbiol* 85 : 521–526.

ENNAHAR S, SASHIHARA T., SONOMOTO K. et ISHIZAKI A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24: 85–106.

EOM H-J., SEO D.M., HAN N.S.(2007). Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int .J. Food Microbiol.*, 117: 61-67

ETTAYEBI K., ELYAMANI J. et ROSSI-HASSANI B.D. (2000). Class II bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Review.* 24 (1) :85-106.

EZE E.N. (1977). Destin de *Brucella abortus* et des anticorps associés dans le lait fermenté traditionnellement *Bull. Santé et prod. anim .Afr.* 25,5-8

F

F.A.O. (1992). Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine, FAO, Rome.

F.A.O. (1995). Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine, FAO, Rome

F.A.O. (2013) . Données statistiques de la FAO, domaine de la production agricole : Division de la statistique, Organisation des Nations Unies.

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

FAYE B. (2003): Performances et productivité laitière de la chamelle: les données de la littérature. Actes de l'Atelier International sur: "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger

FAYE B., JAOUAD M., BHRAWI K., SENOUSSE A. et BENGOUMI M. (2014). Elevage camelin en Afrique du Nord : état des lieux et perspectives, *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **67** (4) :00-00

FARAH Z. et BACHMAN M.R. (1987): Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, **42**, 689-692.

FARAH Z. et RÜEGG M.W. (1989). The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstruct.*, **8**, 211-116.

FARAH Z., STREIFF T. et BACHMAN M.R. (1990). Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *J. Dairy Res.*, **57**, 281-283.

FARAH Z., RETTENMAIER R. et ATKINS D. (1992). Vitamin content of camel milk. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.*, **62**, 30-33.

FARAH Z. (1993): Composition and Characteristics of Camel Milk ; review. *J. Dairy Res.*, **60**, 603-626.

FIMLAND G., AXELSSON L., BRURBERG M.B., NES I.F., EIJSINK V.G., NISSEN MEYER J. (2000). A C-Terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of bacteriology*. 182: 2643-2648.

FLEMING H.P., ERCHELLS J.L et CASLILOW R.N. (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:1040-1042.

G

GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPPEZ R. L. et BEN OMAR N. (2007). Bacteriocin-based strategies. *Int J Food Microbiol* 120: 51-70.

GALVEZ A., LOPEZ R.L., ABRIOUEL H., VALDIVIA E., et BEN OMAR N. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28: 125–152.

GALVEZ A., DAUPHIN R. D., DESTAIN J., CAMPOS D., THONART P. (2012)

Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**(1), 67-76.

GALVIN M., HILL C. et ROSS R.P. (1999). Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays . *Lett. Appl Microbiol* 28: 355-358.

GARVIE E.I (1986). Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In: *Bergeys'Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 1071-1075

GBASSI G.K, VANDAMME T., ENNAHAR S., et MARCHIONI E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int J Food Microbiol* 129 : 103–105.

GIRAFFA G., CARMINATI D., NEVIANI E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737

GONZALEZ L., SANDOVAL H., SACRISTAN N., CASTRO J.M., FRESNO J.M. et TORNADIJO M.E., (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18: 716-722

GONG H. S., MENG X. C. et WANG H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from -.Jiaoke.l, a traditional fermented cream from China. *F Cont.* 2: 89.96

GORBAN A.M.S. et IZZELDIN O.M. (1997). Mineral content of camel milk and colostrum. *J. Dairy Techn.*, **64**, 471-474.

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

GNAN S.O., MOHAMED M.O., SHEREHA A.M. et IWEGBE A.O. (1994) Fermentation ability of camel's milk. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.

GUESSAS B. et KIHAL M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* **3**(6) : 339-342.

GURIRA O. Z., BUYS E.M. (2005). Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology*, 22: 159-168

GUSILS C., CHAIA A.P., OLIVIER G. et GONZALEZ S. (2010). Microtechnique for identification of lactic acid bacteria. *Methods in molecular biology*, Vol. 268 : Public Health Microbiology: Methods and Protocols. *Humana Press*. Totowa. 453-458.

GUIRAUD J.P. (1998). Microbiologie des principaux produits alimentaires ; in : «Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris

GUIRAUD J.P. (2012). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, 651p.

H

HADDADIN M. S. Y., GAMMOH S. I. et ROBINSON R. K. (2008). Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, 75, 8-12.

HADDIE J.M. (1995). The genus *Streptococcus*. In *The genera of Lactic acid Bacteria*. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London. 392, 55 - 124.

HAMMES W.P. et HERTEL C.(2003). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*. 4: 320-403.

HAMMI I., (2017). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. These de Doctorat en Chimie, Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF028

HANAGATA Hiroshi (2003). « Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash », *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 49, n° 2, p. 95-100

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

HASSAN A.A., HAGRASS A.E., SORYAL K.A. et EL-SHABRAWY S.A. (1987). Physicochemical properties of camel milk during lactation period. *Egyptian J. Food Sci.*, **15**, 1-14.

HOWELL T.H, FIORELLINI J. P., BLACKBURN P., PROJAN S. J., DE LA HARPE J. et R.C WILLIAMS R. C. (1993). The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 20: 335-339.

Ho Thi Nguyet Thu, 2008. Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1- France

HECHARD Y., RENAULT D., CENATIEMPO Y., LETELLIER F., MAFTAH A., JAYAT C., BRESSOLIER P., RATINAUD M. H., RAYMOND J., FLEURY Y. (1993). Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines ? *Le Lait*, INRA Editions, 73 (2), pp.207-213.hal-00929329

HEMME D., FOUCAUD- SCHEUNEMANN C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal.*, 14: 467-494

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

HILLS B.P., WRIGHT K.M. (1994). A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *J. Theor. Biol.*168, 31-41.

HOLZAPFEL W.H.(2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiology.*, 75: 197-212

HULSEBUSH C., (1999). Immunoglobulin G status of camels during 6 months post-partum. Hohenheim Tropical Agriculture Series Ed., Verlag publ., Weikersheim (Allemagne), 147 p.

HWANHLEM N., BURADALENG S., WATTANACHANT S., BENJAKUL S., TANI A., MANEERAT S.,(2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407

I

IDOUI T. et KARAM N.E.(2008). Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **59**(4) : 361-367.

ISMAIL M.D., Al-MUTAIRI S.E. (1998): Milk production potential of dairy camels in Northern Saudi Arabia. Dans Dromadaires et chameaux, animaux laitiers: actes du colloque de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994, Coll. Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 35-40.

IZQUIERDO E., MARCHIONI E., AOUDE-WERNER D., HASSELMANN C., et ENNAHARA S. (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multibacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 26: 16–20.

J

JAMALY N., BENJOUA A. et BOUKSAIM M. (2011). Probiotic Potential of *Lactobacillus* strains Isolated from Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. *British Microbiology Research Journal*, 1(4): 79-94.

JANSSEN M., GEERAERD A.H., CAPPUYNS A., GARCIA- GONZALEZ L., SCHOCKAERT G., HOUTEGHEM N.V., VEREECKEN K.M., DEBEVERE J., DEVLIEGHIERE F., et IMPE J. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *Listeria innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability . *Appl. Environ. Microbiol*, 73(5): 1601-1611.

JARDALI Z. (1988). Contribution à l'étude de la composition du lait de dromadaire. DEA présenté à l' ENSAIA, Nancy, France.

JARDALI Z. et RAMET J.P. (1991), cités par **RAMET (1993).**

JAY J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44 :525-532.

JAY J.M. (1986). Modern food microbiology. Ed.III. Van Nostrand Reinhold (New yourk), 234p

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P., BRULE G.(2006). Sciences des aliments. 1. Stabilisation biologique et physicochimique. Tec & Doc, Lavoisier (Ed), Paris, France, 383 p.

JIN L. Z., HOY W., ABDULLAH N., ALI M. A. et JAIALUDIN S. (1996). Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett. Appl. Microbiol*, 23 : 67–71.

JOFFRAUD J.J., CARDINAL M., CORNET J. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*.,

JOMAA A. (2007). Étude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat, Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, Français, NNT : 2007INPL051N 112: 51-61

JOO H.S, et OTTO M. (2015). Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochim Biophys Acta* 1848: 3055–3061.

JOUAN P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides. Propriétés biologiques. INRA publ., Versailles, 127 p.

JUAREZ –TOMAS M.S., BRU E., WIESE B., de RUIZ HOLGADO A.P et NADER –MACIAS M.E.(2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and

bactériocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. J.Appl.Microbiol. 93:714-724.

JUILLARD V., SPINLER H.E., DESMAZEAUD M. J. et BOQUIEN C.Y. (1987). Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utiles en industrie laitière. Lait 67(2):149–172.

JUSTZE Annelies (2008). « Genetic and physiological diversity of Tetragenococcus halophilus strains isolated from sugar- and salt-rich environments », *Microbiology (Reading, England)*, vol. 154, n° Pt 9, septembre, p. 2600-2610

K

KAGEMBEGA J. M. (1984): Contribution à l'étude de la salubrité des laits caillés et yaourt à Dakar. Th. Pharm., Dakar, n° 24.

KALCHAYANAND N., ARTHUR T. M., BOSILEVAC J.M., BRICHTA-HARHAY D. M., GUERINI M. N., WHEELER T. L., KOOHMARAIE M. (2008). Evaluation of various antimicrobial interventions for the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on bovine heads during processing. J Food Prot., 71(3):621-4.

KAMOUN M. (1994). Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie.

KAMOUN M. (1995) : Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatif et aptitude à la transformation. *Option Médit.*, **13**, 81-103.

KAPPELER S., FARAH Z. et PUHAN Z. (1998). Sequence Analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. J. Dairy Res., **65**, 206-222.

KARAM N-E., ZADI-KARAM H., LAZREG L., DALACHE F. (2008). Bactériocines de bactéries lactiques: caractérisation d'une bactériocine d'*Enterococcus* BO2. *Renc. Rech. Ruminants.*, 15: 72

KASSAS Z. (2017). Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de doctorat en microbiologie, option microbiologie appliquée, Université Université B. Mokhtar- Annaba, 158p.

.KEMPLER G.M. et MC KAY L. L. (1980). Genetic evidence for plasmid linked metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1041-1043

KHODJA B. (2018). Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomics, Université Djillali Liabes, SIDI BEL ABBES, p100.

KHAY E., IDAOMAR M., CASTRO L.M.P., BERNARDEZ P.F., SENHAJI N.S. et ABRINI J. (2011). Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk, *Afr J of Biotech* .10 (51): 10447-10455.

KIM Y.M, PAIK H. D. et LEE D. S. (2002). Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. *Journal of the Science of . Food Agric* 82: 998-1002

KLAENHAMMER TR. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-49.

KLAENHAMMER T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, **12**, 39–85.

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

KNOESS K.H., (1977): The camel as a meat and milk animal. *World Animal Rev.*, 22, 39–44

KNOESS K.H., MAKJDUN A.J., RAFIG M. et HAFEEZ M. (1986): Milk Production Potential of the Dromadary with special reference to the province of Penjab *World Anim. Rev.*, **57**, 11 -21

KONUSPAYEVA G., FAYE B. et SERIKBAEVA A. (2003): Les produits laitiers traditionnels à base de lait de chamelle en Asie centrale. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger

KONUSPAYEVA G., LOISEAU G., FAYE B. (2004). La plus-value « santé » du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan. Proc. 11 Rencontre autour des Recherches sur les Ruminants, INRA, Paris 8-9 décembre, 2004

KOO S.P., BAYER A. S. et YEAMAN M. R. (2001). Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides . *Infection and immunity* 69: 4916-4922

KOORT J. (2006). Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with nonfermented meats. Ph.D. thesis. Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki, Finland.

KRIER F., REVOL- JUNELLES A.M. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 Dring batch fermentation. *Appl.Microbiol Biotechnol.* 50 :359-363.

L

LABIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M. et OUHSSINE M. (2005). Selection de souches de bacteries lactiques antibacteriennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144 : 237-250.

LACHANCE M. (2000). 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.

LAHELEC C. et COLIN P. (1991). Méthode d'évaluation des différentes microflores à incidence technologique: la flore psychrotrophe. In : techniques d'analyses et contrôle dans les IAA, Tee. & Doc., Vol.3, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris

LAMARI F. (2014). Utilisation de bactéries lactiques probiotiques pour prémunir les poissons d'élevage contre des vibrions pathogènes. Thèse de doctorat, Spécialité : Biologie Marine Sciences Biologiques et Biotechnologie, Université de Bretagne Occidentale (UBO), 277p.

LANCIOTTI R., PATRIGNANI F., BAGNOLINI F., GUERZONI M. E., et GARDINI F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20, 537-543.

LARPENT J. P. (1996). Les bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33

LARPENT J.P., COPIN M.P., GERMONVILLE A., JACQUET M. et THETAS J.L. (1997). Microbiologie du lait et des produits laitiers ; in : « Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris

LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMED M.A. (1986). Analysis of the Casein in Camel (*Camelus dromedaries*) milk . *J. Agric. Res.*, 16 , 13-18.

LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMED M.A. (1994). Camel's (*Camelus dromedarius*) Milk : properties important for processing procedures and nutritional value. Actes du Colloque : « Dromadaires et chameaux animaux laitiers », 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

LEKSIRE C. (2013). Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. MEMOIRE de Magistère en : *Sciences Alimentaires*, Option : *Biotechnologie Alimentaire*, Université Mentouri de Constantine, 162p.

LEONARD L. (2013). Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse de doctorat en Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France. NNT : 2013DIJOS044, 319p.

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 diacety lactis* UL719 , sur *Candida albicans*, Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.), Université de Laval, Quebec, 87p.

LEROY F., DE WINTER T., ADRIANY T., NEYSENS P. et DE VUYST L. (2006) .Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int J Food Microbiol* 112: 102-111.

LIM S.M. (2010). Cultural condition and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. *Food Sci. Biotechnol.* 19: 793-802.

LINDEN G. (1994). In Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole., D. Lorient. MASSON Paris Milan Barcelone, p.114-116.

LIU S.Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International journal of food microbiology*, **83**, 115–131.

LOISEAU G., FAYE B., SERIKBAEVA A., MONTET D. (2001). Int. Conf. On new horizons in biotechnology, 18-21 avril 2001, Trivandrum, Inde.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.

M

M.A.D.R., 2013 - Rapport des statistiques agricoles, Alger, 128 p.

MAGHNIA D. (2011). Etude de potentiel technologique des bactéries lactique isolée des aliments fermentes traditionnels algeriens. Mémoire de magister, option microbiologie alimentaire, Université d'Oran, 126p.

MAHBOUB N, (2010). Contribution à l'amélioration de la fromageabilité du lait camelin : Etude des conditions de conservation des enzymes gastriques camelines (type présure)' ; Mémoire de magister en biochimie et analyse des bioproduits ; Université Kasdi Merbah Ourgla, 97p.

MAILLOT M.(1985). Les toxi-infections alimentaires par les produits laitiers Th. Méd. Vét., Toulouse, n° 85, 99 p.

MAKHLOUFI.K. M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)

MALDONADO A., RUIZ – BARBA J.L et JIMENEZ –DIAZ R. (2003). Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):383-389.

MALE M., FRANK S. G. VIA G.F. et BENGOU MI M. (2003) : Contrôle enzymatique de la pasteurisation du lait de chamelle et mise au point d'un test pratique Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger

MALHEIROS P.S, CUCCOVIA I. M. et FRANCO B.D.G. (2016). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Food Control* 63: 158-164.

MAMI A. (2007). Le biocontrôle de *Staphylococcus aureus* par les bactéries lactique de genre *Lactobacillus* isolée du lait cru de chèvre. Université d'Oran ,183p.

MAMI A., HAMED I., HENNI J., KERFOUF A., KIHAL M. (2010). Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE -2010, volume 5, N°21

- MAMI A. (2013).** Recherches des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie, Thèse de Doctorat Spécialité : Microbiologie Appliquée, Université d'Oran. 176p.
- MAMI A., KERFOUF A., KIHAL M. (2014).** Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Raw Goat's Milk from the Region of Western Algeria. *Inter J of Sci: Basic and Appl Rese (IJSBAR)* 13(1): 18-27.
- 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.
- MARTINEZ D., (1989):** Note sur la production de lait de dromadaire en secteur périurbain en Mauritanie. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 42, 115–116
- MARTINEZ Muracia, A.J et COLLINS, M.D. (1990).** Phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* 70: 73:84.
- MARTINEZ R.C., STALIANO C.D., VIEIRA A. D., VILLARREAL M. L., TODOROV S. D., SAAD S. M. et FRANCO B.D. (2015).** Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread . *Food Microbiol* 48 : 143-152.
- MATARAGAS M., METAXOPOULOS J., GALIOTOU M. et DROSINOS E.H. (2003).** Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Meat Sci.* vol64, pp265-271.
- MAURIELLO G., ERCOLINI D., LA STORIA A., CASABURI A. et VILLANI F. (2004).** Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J. Appl Microbiol* 97: 314-322
- MAYEUX J.V., SANDINE W.W.E. et ELLIKER P.R. (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy. Sci.* 45: 655-656.
-

MC AULIFFE O. et HILL C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 285-308.

MC KAY L.L et BALDWIN K.A. (1990). Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria ». *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 3-14.

MECHAI A. (2009). *Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat en biochimie, Université Badji-Mokhtar- Annaba.*99p

MEHAIA M.A. (1987). Studies on camel milk casein micelles ; treatment with soluble and immobilized pepsin. *Arab Gulf J. Sci. Res. Agric. Biol. Sci.*, **3**, 391-400.

MEHAIA M.A. (1992). Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin. *Egyptian J. Dairy Sci.*, **20**, 31-40.

MEHAIA M.A. (1993) Composition, yield and organoleptic evaluation of the fresh Domiati cheese made from a mixture of camel and cow Milk. *Aust J. Dairy Techn.*, **48**, 74-77.

MEHAIA M.A. (1995). The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, **50**, 260-263.

MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. et EL-MOUGY S.A. (1995). Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chem.*, **52**, 115-122.

MERZOUK Y. (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 bactériocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 in response to temperature

and pH value used for European sausage fermentation process. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41-52.

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 .

MILLES S., STANTON I.C., HILL C. et ROSS R. P. (2011). New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 2 : 299-329

MOHAMED M.A., MURSAL A.I. et LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. (1989). Separation of camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, **44** (5), 278-280.

MOHAMED M.A., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M., et MOHAMUD M.A. (1990). Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, **45**, 716-718.

MONSALLIER G., (1994) cité par **DIENG (2001)**

MONTVILLE T. J. et WINKOWSKI K. (1997). *Biologically based preservation systems and probiotic bacteria.* In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* ASM, Washington DC.

MONTVILLE T.J. et CHEN Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions, *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 511-519.

MORISSET D., BERJEAUD J. M., FRERE J., HECHARD Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques **In** Bactéries lactiques et probiotiques. Luquet F-M, Corrieu G. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 113-194

MUNOZ A., ANANOU S., GALVEZ A., MARTINEZ-BUENO M., RODRIGUEZ A., MAQUEDA M. et VALDIVIA E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat." *Int Dairy J* 17: 760-769.

N

NARSAIAH K., WILSON-ROBIN A., GOKUL K., MANDGE H.M., JHA S.N., BHADWAL, SHEETAL, ANURAG, RAHUL K., MALIK R.K., VIJ S. (2015).Effect of bacteriocin incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol Technol* 100 : 212–218.

NDAO S. (1996): Contribution à l'étude de la contamination des laits caillés artisanaux sénégalais par les staphylocoques présumés pathogènes. Th. Méd. Vét., Dakar, n° 18, 61 p.

NES I.F., DIEP D.B., HAVARSTEIN L.S., BRURBEG M.B., EIJSINK V., HOLO H., (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70: 113- 128

NES I. F., YOON S.S. et DIEP D.B. (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. *Review Food Sci Biotechnol* 16: 675-690

NETTLES C.G. et BAREFOOT S.F. (1993).Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot* 56 : 338-356.

NICHOLLS D.J. et FERGUSON S.J. (1992).*Bioenergetics: Chemiostatic energy transduction.* 2. Edited by D.G Nicholls, & S.J Ferguson. London: Académie Press.

NIGUTOVA K., MOROVSKY M., PRISTAS P., TEATHER R.M., HOLO H., JAVORSKY P. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2): 563-569.

NILSEN T., NES I.F., HOLO H.(2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2975-2984

NOVEL G. (1993). Les bactéries lactiques **In** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau J-Y., Bouix M. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp : 170-374

O

OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C., SAIHI A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int J Food Microbiology.*, 126: 286-290

ORLA-JENSEN S. (1919). The Lactic Acid Bacteria. Dairy Bacteriology, Fred Hostand Son, Copenhagen

O'SULLIVAN L., MORGAN S. M., ROSS R. P. et HILL C. (2002). Elevated Enzyme Release from Lactococcal Starter Cultures on Exposure to the Lantibiotic Lacticin 481, Produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J Dairy Sci.*, 85(9):2130-40.

P

PAPAGIANNI M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*21(6), 465-499.

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

PARENTE E et RICCAIRDI A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 :628-638.

PATRYKAT A., FRIEDRICH C.L., ZHANG L., MENDOZA V., et HANCOCK R.E. (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 605-614.

PEREZ R.H., ZENDO T. et SONOMOTO K (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbl Cell Fact* 13 (Suppl 1) : S3.

PESCHEL A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides. *Trends in microbiology* 10: 179-186.

PEYRE DE FABREGUES B. (1989): Le dromadaire dans son milieu naturel. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 42, 127-132.

PILET M. F., MAGARAS C. et FEDERIGHI M. (2005). Bactéries lactiques **In** Bactériologie alimentaire “compendium d’hygiène des aliments”. Federighi M. *Economica*, pp: 219-242

PITON C. (1988). Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Le Lait, INRA*, 68 (4), pp.419-433., hal-00929141

R

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

RAMET J. P. (1987): Production de fromages à partir de lait de chamelle en Tunisie. Rapport mission FAO, Rome, 1–33

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

RAMET J.P. (1994). Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

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 (2003).

RICHARD D. et GERARD D. (1989): La production laitière des dromadaires Dankali (Ethiopie). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trp.*, 42, 97-103.

RICHARD C., CANON R., NAGHMOUCHI K., BERTRAND D., PREVOST H. et DRIDER D. (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol* 23: 175-183.

RILEY M.A., WERTZ J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137

ROBINSON T.P., OCIO M.J., KALOTI A., MACKEY B.M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 83-92.

RODRRIGUEZ E., GONZALEZ B., GAYA P., NUNEZ M., MEDINA M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* , Volume 10, Issues 1–2, Pages 7-15

RODRIGUEZ J.M., MARTINEZ M.I et KOK J. (2002). Pediocin Pa-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42:91-121.

ROSS R.P., STANTON C., FITZGERALD G.F. et COFFEY A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends Foods Sci Technol* 11: 96-104.

S

SABUMUKAMA C. (1997). Recherche d'enzymes adaptées pour la vérification de la pasteurisation du lait de dromadaire et mise au point d'un test simple de contrôle. Mémoire mastère ENSIA, Montpellier. 45 p.

SAIDI N., GUESSAS B., BENSALAH F., BADIS A., HADADJI M., HENNI D.E., PREVOST H. et KIHAL M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11

SALEY M. (1993). La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Ed Maison-Alfort, Paris.

SALMINEN S., GORBACH S., YUAN-KUN L., BENNO Y. (2004). Human studies on probiotics: What is scientifically proven today, **In** Lactic Acid bacteria : Microbiological and

functional Aspects. Eds salimen S., von Wright A., Ouwerhand A., *New york Dekker M.* pp: 515-530

SAVADOGO A. , OUATTARA CHEUK A.T., BASSOLE IMAEL H. N., TRAORE S. ALFRED (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology.*, 5 (9): 678-683

SAWAYA, W. N., KHALIL, J. K., AL-SHALHAT, A. & AL-MOHAMMAD, H. (1984). Chemical Composition and Nutritional Quality of Camel Milk. *Journal of Food Science* 39 : 744-747.

SAWAYA W. N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A. et AL-MOHAMMAD H. (1989). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci.*, **49**, 744-747

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.

SBOUI A., DJEGHAM M., BELHADJ O. et KHORCHANI T. (2016). Le lait de chamelle: qualités nutritives et effet s ur les variations de la Glycémie. Zaragoza : CIHEAM, Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 115, pages 487- 492

SCHLEIFER K.H. (1987.) Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. vol. 46, 201-203

SCHILLINGER U. et LUKE F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology.*, 4: 199-208

SCHILLINGER U. et LUKE F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ . Microbiol*, 55 :1901–1906.

SCHLEIFER K.H., STACKEBRANDT E. (1983). Molecular systematics of procaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 143-187.

SCHLEIFER K.H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BALZ R., COLLINS M.D., FISHER W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 183-195

SCHLEIFER K.H. et KILPPER-BALZ R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19

SCHLEIFER K. H. et LUDWIG W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* 18: 461-467

SCHUTZ H. et RADLER F. (1984). Propanediol-1, 2-dehydratase and metabolism of glycerol of *Lactobacillus brevis*. *Archives of microbiology*, **139**, 366–370.

SCHWARTZ E. (2016). La vitamine C. DESS de cosmetologie, monographie, Université de Québec à Chicoutimi (UQAC).

SEMASAKA G. (1986): Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar. Th. Méd. Vét., Dakar, n° 6, 133 p.

SI AHMED- ZENNIA S. (2015). Isolement et séparation des protéines sériques du lait de chamelle : mise en évidence du phénomène de désamidation de l' α -Lactalbumine ; conséquences sur la stabilité structurale. Thèse de doctorat en biologie, option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri, Tizi ousou, 157p.

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.

SIBOUKEUR O. K. (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 (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. K. (2012). Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle collecté localement en comparaison avec le lait bovin. *Annales des Sciences et Technologie* Vol. 4, N° 2.

SIBOUKEUR A. et SIBOUKEUR O. K. (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 A. (2018). 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. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 166p.

SONDERGAARD A.K. (2005). Application of probiotics in food. **In** Bactéries lactiques et probiotiques. Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 195-209

SOUID W. (2011) .Effect des bactériocines(type nisine) produites par des 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., HOLZAPFEL W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food Microbiol*, 36: 1-29

SUMA K., MISRA M.C., VARADARAJ M.C. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat- stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 17-25

T

TAALE E., CHEIHNA Z., SAVADOGO A., TAPSO F., (2016) Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines Antimicrobial peptides from microbes: case of bacteriocins, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10(1): 384-399

TABAK S. et BENSOLTANE A. (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Revue « Nature & Technologie »*. n° 06/Janvier, Pages 71 à 79.

TAGG J.R., MC GIVEN A.R. (1971). Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol*, 21 :943.

TAGG J.R., DAJANI A.S et WANNAMAKER L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, *Bacteriological Re-views.* 40: (3)722-756

TATTEVIN P., LORLEACH A. et REVEST M. (2014). Innovative treatments for multidrug-resistant bacteria ." *Bull Acad Natle Méd* 198: 439-457.

TAYLOR G.D., KIBSEY P., KIRLAND T., BURROUGHS E. et Tredget E. (1992). Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit . *Burns* 18 (1992): 332-335.

TEN BRINK B., MINEKUS M., VANDER VOSSEN J.M. B.M., LEER R.J. et HUIS IN'T VELD J.H.J. (1994). Antimicrobial activity of *Lactobacilli*: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus M46*. *J..Appl. Bacteriol*, 77 :140–148.

TODORV S.D. et DICKS L.M.T. (2005). Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1585-1590.

TRABELSI H. (2016). Rôle du dromadaire dans la régénération et la prolifération du couvert floristique des parcours du Sahara septentrional algérien. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 113p.

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* 123.p 50–60

TWOMEY D., RYAN M., MEANEY B. et HILL C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 165-185.

V

VAN DE VENET F.J., VAN DEN HOOVEN H.W., KONONGS R.N. et HILBERS C.W. (1991). NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution . *European journal of biochemistry / FEBS* 202, 1991: 1181-1188.

VAN TIEGHEM P.E.L. (1878). Sur la gomme de sucrerie. *Ann. Sei. Nat. Bot.*, 6: 180-202

VELA A.I., GARCIA N., LATRE M.V., CASAMAYOR A., SANCHEZ –PORRO C., BRIONES V., VENTOSA A., DOMINGUEZ L et FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F. (2007). *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 1291-1294.

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.*, 70, 5081-5088

VOS P., GARRITY G., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K.H., WHITMAN W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3: the *Firmicutes*, Springer USA, 1422 p.

W

WALTER J., HERTEL C., TANNOCK G.W., LIS, C.M., MUNRO K et HAMMES W.P (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in

human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 : 2578-2585.

WANGO J., FARAH Z., PUHAN Z. (1998): Iso-electric focusing of camel milk proteins. *Int. Dairy J.*, 8, 617-621.

WILSON R.T., (1984): The camel. Ed. Longman, London

WISEMAN D. W. et APPLEBAUM T. (1983): Distribution and resistance to pasteurisation of aflatoxin M₁. In naturally contamination, whole milk, cream and skin milk. *Journal of food prod.*, 46 , 530-532.

WORAPRAYOTE W., KINGCHA Y., AMONPHANPOKIN P., KRUEENATE J., ZENDO T., SONOMOTO K., BENJAKUL S. et VISESSANGUAN W. (2013).Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork." *Int J Food Microbiol* 167: 229-235.

Y

YAGIL R. et ETZION Z. (1980a): Effect of drought conditions on the quality of camel milk. *J. Dairy. Res.*, 47, 159-166.

YAGIL R. et ETZION Z. (1980b): Milk Yields of Camel (*Camelus dromedarius*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 67, 207-209.

YAGIL R. (1982): Camels and Camel Milk. FAO, Animal Production and Health, Paper N° 26, 1-69.

YAGIL R. (1985): The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed KARGER, 109-120.

YAGIL R., (1986): The camel : self-sufficiency in animal protein in drought stricken areas. *World Animal Rev.*, 57, 2-10.

YAGIL R., ZAGORSKI O. et VAN CREVELD C. (1994). Science and Camel's Milk Production. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

Z

ZADI-KARAM H., KACEM M. et N.E. KARAM N. E. (2003). Lait de chamelle : Acidification et Effet de la flore endogène ou de bactéries lactiques exogènes sur le contenu protéique. Renc. Rech. Ruminants,10.

ZADI 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, **24**, 3, 153-156

ZAGULKI T. (1989) in KONASPAYEVA et al. (2004).

ZALAN Z., BARATH A. et HALASZ A. (2005).Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains." *Food Technol Biotech* 43: 219-225.

ZAROOR K., BENMECHERNENE Z., HADADJI M., MOUSSA-BOUDJEMAA B., HENNI D. J. et KIHAL M. (2012). Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. Afr JI of Microb Res Vol. 6(13), pp. 3192-3201

Annexes

ANNEXES

Annexe N°1 :

Dosage de la vitamine C

Prélever V1= 10 ml de lait et les introduire dans l'erenmeyer. Ajouter ensuite V2=30mL de solution de diiode et mélanger. Remplir la burette avec la solution de thiosulfate et ajuster au zéro. Attendre environ 5 minutes. Rajouter 4 gouttes d'empois d'amidon dans l'erenmeyer puis procéder au titrage de l'excès de diiode par le thiosulfate. Arrêter l'ajout de thiosulfate dès que la solution se décolore. Noter alors le volume versé V3.

$$C_{vitc} = V2 * C2 - \frac{1}{2} (V3 * C3)$$

D'où :

C vit c : concentration de vitamine c

V2 : volume de solution de diiode

C2 : concentration de solution de diiode

V3 : volume de solution de thiosulfate de sodium

C3 : concentration de solution de thiosulfate de sodium

Annexe N°2 : Les milieux des cultures utilisés

Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure.....	5 g
Extrait de viande.....	10 g
Peptone.....	10 g
Acétate de sodium.....	5 g
Citrate de sodium.....	2 g
Glucos.....	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée.....	1000 ml

pH =6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone.....10 g
Extrait de levure.....5 g
Saccharose.....100 g
Citrate de sodium.....1 g
Glucose.....5 g
Gélatine.....2,5 g
Azothydrate de sodium.....0,75 g
Eau distillée.....1000 ml
pH..... 6,5

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone papainique de soja..... 5g
Peptone trypsique de caséine.....2,5 g
Peptone pepsique de viande..... 2,5 g
Extrait de levure.....2.5 g
Extrait de viande.....5 g
Glycérophosphate de sodium.....19g
Sulfate de magnésium..... 0.25 g
Acide ascorbique.....0.5 g
Agar.....15g
Eau distillée.....950ml

pH 7,1 ± 0.2

50 ml de lactose à 10 % sont ajouté après autoclavage 20min à 120°C

Milieu Garvier (1986)

Peptone.....20g
Glucose.....10g
Chlorure de sodium.....5g
Extrait de levure.....6g
Extrait de viande.....10g
Citrate d'ammonium.....5g

pH =6.5

Répartir en tubes à essais (8-10 ml) Autoclaver 15 min à 120°C.

Gélose nutritive

Extrait de viande.....5 g
Peptone.....10 g
Chlorure de sodium.....5 g
Agar.....15 g
Eau distillée.....1000 ml

pH = 7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf.....3000 cm³
Peptone de caséine..... 17,5 g
Amidon de maïs.....1,5 g

Milieu Chapman

Tryptone.....5,0 g
Peptone pepsique de viande.....5,0 g
Extrait de viande.....1,0 g
Mannitol.....10,0 g
Chlorure de sodium.....75,0 g
Rouge de phénol.....25,0 mg
Agar agar.....15,0 g
Eau distillée.....1000 ml
pH =7.4
Agar-agar.....17 g

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Lait écrémé

Lait écrémé.....100 g
Extrait de levure.....3 g
Eau distillée.....1000 ml

pH=7

Autoclavage 110°C, 10 minutes

Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure.....3 g
Biopolytone.....2,5 g
Glucose.....5 g
Eau distillée.....1000 ml

pH=.....6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé (121°C, 15min). Au moment de l'emploi, 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) sont ajoutés.

Ces solutions sont stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) et sont conservées à l'obscurité à +4°C.

Milieu de Naylor et Sharp

Peptone.....10g
Extrait de levure.....3g
Glucose.....5g
Extrait de viande.....10g
Chlorure de sodium.....5g

PH=7

Répartir en tubes à essais (9-10ml) ou en erlenmeyers.

Autoclaver 15 min à 120 °C.

Milieu Gibson et Abdel Malek

Extrait de levure.....2.5g
Glucose.....50g

Jus de tomate à PH 6.5.....100ml
Lait.....800ml
Gélose nutritive ordinaire.....200ml

PH=6.5.

Repartir en tubes à essais (8-10ml).

Stériliser par tyndalisation, 3 fois 30 minutes à 100°C, à 24 heures d'intervalle.

Mlieu Falcaw

Extrait de levure.....3g
Glucose.....1g
Chlorure de sodium.....5g
Pourpre de bromocrésol.....16mg

Ajouter 5g/l d'arginine (test ADH)

PH=6.3. Répartir en tubes à essais (4.5-8ml).

Autoclaver 15 min à 120°C.

Gélose semi-solide au lait citraté

Lait écrémé à 10% 10.5ml
Citrates de sodium..... 0.5ml

Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

Gélose au sang

Mélange spécial de peptones.....23g
Amidon.....1g
NaCl.....5g
Agar.....10g
Sang de mouton.....50ml

PH=7.3

1. Liquéfier la base au bain-marie bouillant.
 2. Attendre son refroidissement à 45°C (milieu en surfusion).
-

3. Y ajouter stérilement, à l'aide d'une pipette Pasteur (1 goutte = 0,05 mL), la quantité de sang nécessaire pour obtenir une concentration finale en sang de 5%.

Milieu VRBG

Peptone.....7g
Extrait de levure.....8g
Glucose.....10g
Chlorure de sodium.....5g
Rouge neutre.....30mg
Cristal violet.....2mg
Gélose.....12g

PH=7.4.

Stériliser par 15 min d'ébullition (ne pas autoclaver)

Milieu VRBL

Peptone.....7g
Extrait de levure.....3g
Lactose.....10g
Chlorure de sodium.....5g
Rouge neutre.....30mg
Cristal violet.....2mg
Gélose.....12g

PH=7.4.

Stériliser par 15 min d'ébullition (ne pas autoclaver)

Milieu gélose esculine :

Peptone.....10g
Esculine.....1g
Citrate de fer ammoniacal1g
gélose20g
Eau distillée 1000ml

pH 7,

Stérilisation 20 min à 120°C

Milieu Clark et Lubs

Peptone 7g
Phosphate dipotassique.....5g
Glucose5g
Eau distillée 1000ml

pH 7,

autoclaver 20 min à 120°C

Tampon phosphate 0,1 M pH 7

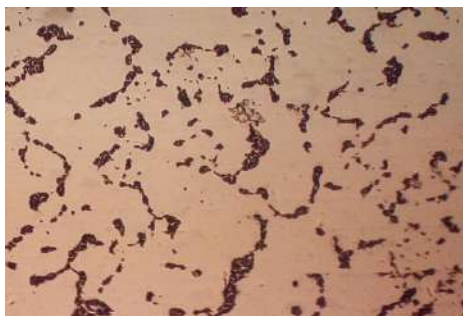
On mélange un volume de phosphate monopotassique 0,1M (13,617 g/l) avec deux volumes de phosphate disodique 0,1 M (17,814 g/l).

Stérilisation à 110° pendant 20mn

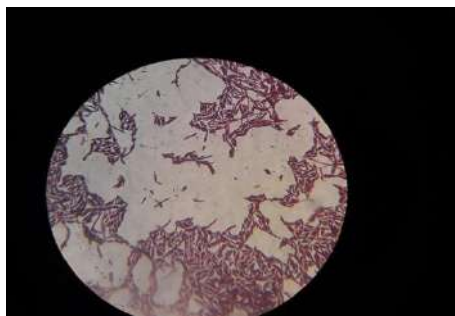
Remarque : gélose semi -molle contient 0.7% d'agar (=0.7g pour 100 ml d'eau distillé)

Gélose à 15 % (15 g d'agar pour 100ml d'eau distillé)

Annexe N°03 : Examen microscopique de A : *Leuconostoc* B : *Lactobacillus*

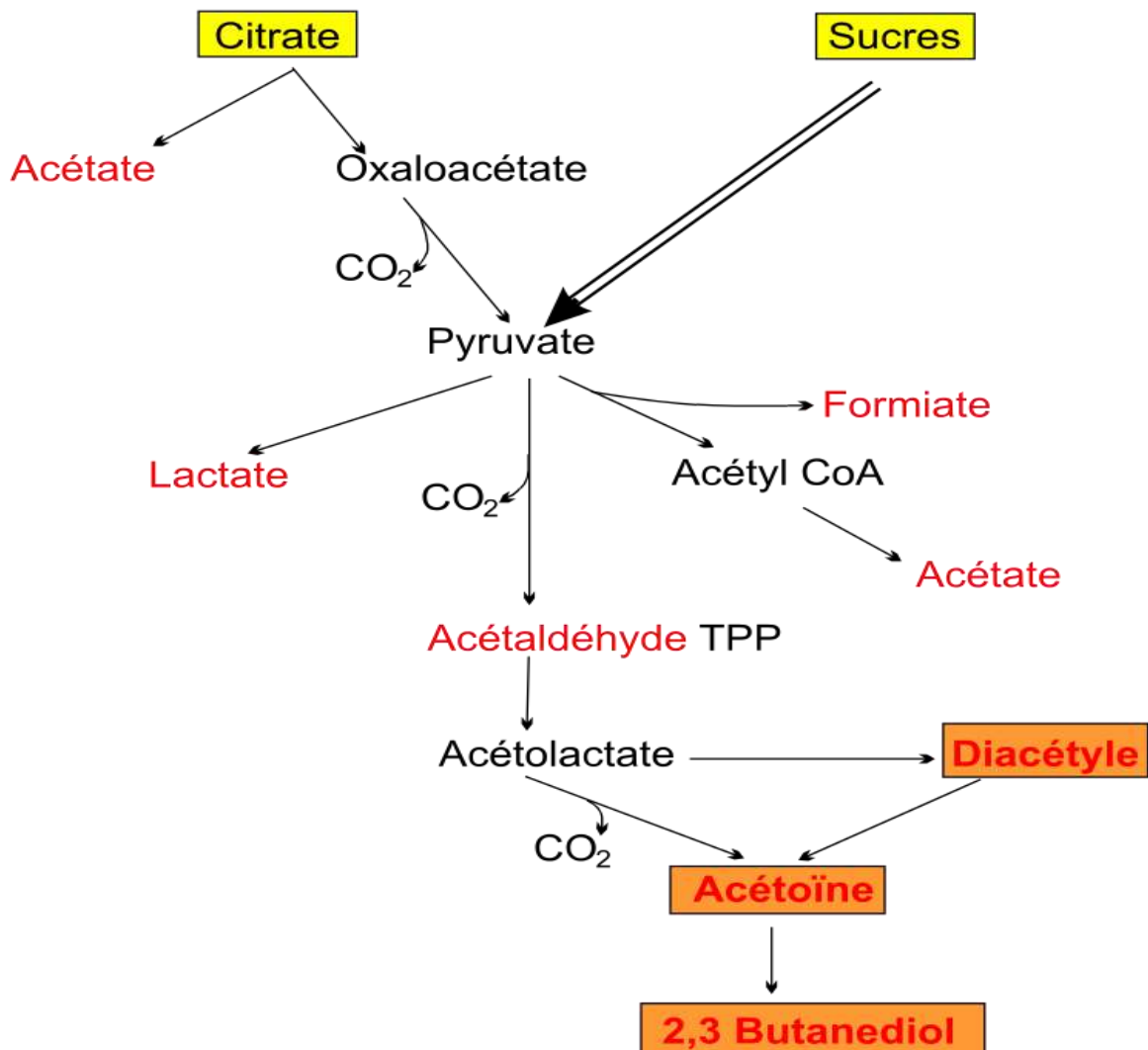


A



B

Annexe N°04 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques



Annexe N°5 : Identification par la Galerie API 50 CH

Principe

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les tests de fermentation sont inoculés avec API 50 CHL Medium qui réhydrate les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi (Bromocrésol Pourpre pour API 50 CHL Medium,). Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

Préparation des galeries

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40-49.

Préparation de l'inoculum

- Cultiver le microorganisme sur un milieu adapté à sa croissance (MRS, M17 et MSE).
- Vérifier la pureté de la souche.
- Récolter cette culture par écouvillonnage d'un milieu solide, ou par centrifugation d'un milieu liquide.
- Préparer l'inoculum dans le milieu approprié (API 50 CHL Medium), cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation des galeries

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.

Incuber les galeries 37°C/ 24H et 48H.

Pour l'interprétation des résultats se référer aux tableaux d'identification associés aux galeries.

Annexe N°6 : Identification par la Galerie API 20 STREP

Principe

La galerie API 20 STRP comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Préparation de l'inoculum

API 20 Strep ne doit pas être utilisé directement, les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

Après isolement et vérification de l'appartenance de la souche à identifier à la famille des *Streptococcaceae* (réaction de Gram, catalase) :

- Prélever une colonie bien isolée et la mettre en suspension dans 0,3 ml d'eau stérile. Bien homogénéiser.
- Inonder une boîte de gélose Columbia au sang de mouton avec cette suspension.
- Incuber la boîte 24 heures (± 2 heures) à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en anaérobiose.

Préparation de la galerie

Comme indiqué précédemment.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie

- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule) :

- pour les tests VP à LAP : environ 100 μl dans chaque cupule.

- pour le test ADH : remplir uniquement le tube.

- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :

- ouvrir une ampoule d'API GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.

- répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.

Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.

Refermer la boîte d'incubation.

Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

Lecture de la galerie

Après 4 heures d'incubation :

□□Ajouter les réactifs :

- test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2.

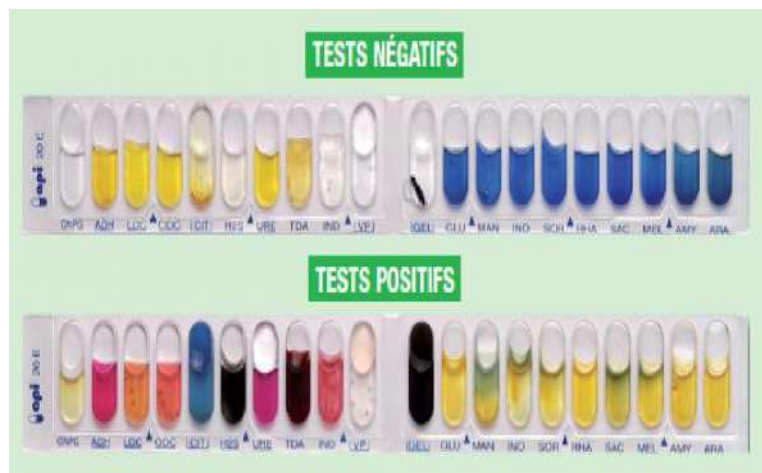
- test HIP : 2 gouttes de NIN.

- tests PYRA, □GAL, βGUR, βGAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B

Identification est réalisée à partir de la base de données à l'aide du Catalogue Analytique ou à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™**



Galerie api 50 CH



Galerie api 20 STREP