



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE

L'UNIVERS

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Effets de quelques cryoprotecteurs sur la
conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir
du lait camelin**

Présenté par : M^{elle} BALLA Asma

Devant le jury :

Président:	Mr. ADAMOUC A.	Maître de conférences A	U.K.M.Ouargla
Promotrice:	Mme SIBOUKEUR O.	Maître de conférences A	U.K.M.Ouargla
Examineurs:	Mr. OULD EL HAJD M.D.	Professeur	U.K.M.Ouargla
	M ^{me} OULD EL HAJD A.	Maître de conférences A	U.K.M.Ouargla

Année universitaire 2010-2011

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier très vivement madame SIBOUKEUR O., Maître de conférences A à l'université d'Ouargla, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

Monsieur ADAMOUC A., Maître de conférences A qui me fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance.

Monsieur le professeur OULD EL HAJD M. D. et Madame OULD EL HAJD A., Maître de conférences A pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, je remercie tous mes collègues (Fatma, Amel, Wafa, Sara, Wassila, Amina SIBOUKEUR, Amina DJARBAOUI, Madame Atika, Sawsane, Amine et Touhami), qui ont fait que ce travail s'est passé dans une bonne ambiance.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée

A

La mémoire de mon père ;

Ma chère mère ;

Mes frères ;

Ma chère sœur ;

Mes amies.

Table des matières

Table des matières

	pages
Introduction générale	1
I. Synthèse bibliographique	3
1.1 Le dromadaire	3
1.1.1 Alimentation du dromadaire	4
1.1.2 Importance du dromadaire	4
1.1.3 Répartition géographique	4
1.1.3 Les races algériennes	5
1.1.5 Production laitière	5
1.2 Le lait de chamelle	6
1.2.1 Composition et propriété physicochimique du lait	6
1.2.2 Propriété médicinale	7
1.2.2.1 Lactoferrine	8
1.2.2.3 Immunoglobulines	8
1.2.2.4 Lactoperoxydase	8
1.2.2.5 Vitamine C	9
1.2.2.6 L'insuline	9
1.2.3 Propriété technologique et produits fermentés	9
1.3 Les ferments lactiques	10
1.3.1 Découverte des bactéries lactiques	10
1.3.2 Définition et caractéristiques principale	10
1.3.3 Applications	13
1.3.4 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées	13
1.3.4.1 Activité acidifiante	13
1.3.4.2 Production de métabolites d'intérêt	14
1.3.4.3 Propriétés enzymatiques	14
1.3.4.4 Propriétés spécifiques aux probiotiques	14
1.3.4.5 Critères de performance	14
1.3.5 Microbiologie du lait camelin et ces dérivés	14

1.3.6	<i>Streptococcus thermophilus</i>	15
1.3.6.1	Caractéristique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
1.3.7	Utilisation industrielle des ferments lactiques	17
1.3.8	Avantages de l'utilisation des ferments concentrés	18
1.4	Conservation et formes commerciales des ferments lactiques	18
1.4.1	Congélation	19
1.4.2	Lyophilisation	19
1.4.2.1	Lyophilisation des bactéries lactiques	19
1.4.2.2	Description et principes de la lyophilisation	19
1.4.2.2.1	Congélation	19
1.4.2.2.2	Dessiccation	20
1.4.3	Cryoprotection des bactéries lactiques	20
1.4.3.1	Mécanisme d'action des cryoprotecteurs	21
II-	Matériels et méthodes	23
2.1	Matériel d'étude	23
2.1.1	Echantillon de lait camelin	23
2.1.2	Milieux de culture	23
2.1.3	Appareillage	24
2.1.4	Petit matériel	24
2.1.5	Produits chimiques et réactifs	24
2.2	Méthodes analytiques	24
2.2.1	Analyses physicochimiques du lait	24
2.2.1.1	Mesure de pH	24
2.2.1.2	Mesure de la densité	25
2.2.1.3	Mesure de l'acidité dornic	25
2.2.2	Analyses microbiologiques	25
2.2.2.1	Test de la réductase	25
2.2.2.2	Isolement de la souche lactique d'intérêt	27
2.2.2.3	Ensemencement dans un milieu sélectif	27
2.2.2.4	Identification de la souche	27
2.2.2.4.1	Analyses préliminaires	27
2.2.2.4.1.1.1	Observation macroscopique	27
2.2.2.4.1.1.2	Observation microscopique	28
2.2.2.4.1.1.2.1	Examen à l'état frais	28
2.2.2.4.1.1.2.2	Examen après Coloration de GRAM	28
2.2.2.4.1.2	Test de la catalase	28
2.2.2.4.1.3	Test de l'oxydase	28
2.2.2.4.2	Identification physiologique et biochimique	29

2.2.2.4.3 Propagation de la souche	30
2.2.2.4.3.1 Préparation de préculture	30
2.2.2.4.4 Mesure de la densité optique	30
2.2.2.4.5 Mesure du poids sec	30
2.2.2.4.6 Numération avant conservation	31
2.2.3 Conservation des souches isolées	31
2.2.3.1 Préparation de milieu de conservation	31
2.2.3.2 Préparation et inoculation des tubes de conservation	32
2.2.3.3 Congélation	32
2.2.3.4 Lyophilisation	32
2.2.3.5 Numération après conservation	32
III - Résultats et discussions	34
3.1 Qualité physico-chimique du lait	34
3.1.1. Ph	34
3.1.2. Acidité titrable	34
3.1.3 Densité	35
3.2. Analyse microbiologique	35
3.2.1. Test de la réductase	35
3.2.2. Identification de la souche d'intérêt isolée et purifiée	36
3.2.2.1. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche isolée	36
3.2.2.2 Observations, macroscopique et microscopique	38
3.2.3. Mesure de la densité optique	39
3.3. Conservation des souches isolées	41
3.3.1 Numération avant conservation	41
3.3.2 Numération sans et avec cryoprotecteurs	41
Conclusion générale	52
Références bibliographiques	53
Annexes	

Liste des abréviations

CPE	Cryoprotecteur extracellulaire
Congel	Congélation
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DO	Densité optique
IgG	Immunoglobuline G
Lyoph	Lyophilisation
Mbar	Millibar
UFC	Unité formant colonies
U.I	Unité internationale

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De ROISSART et LUQUET, 1994)	12
2	<i>Streptococcus thermophilus</i> (BOUDJEMAA, 2008)	16
3	Procédure expérimentale	26
4	Mesure de la densité optique en fonction de la durée d'incubation de la souche de <i>Streptococcus thermophilus</i>	39
5	Courbe d'étalonnage de la concentration en biomasse	40
6	Courbe de croissance de la souche <i>Streptococcus thermophilus</i>	40
7	Effet de la nature du traitement de concentration en l'absence de cryoprotecteurs, sur la survie de la souche en fonction du temps de stockage	42
8	Comparaison de l'effet des trois cryoprotecteurs sur la souche congelée en fonction du temps de stockage	45
9	Comparaison de l'effet des trois cryoprotecteurs sur la souche lyophilisée en fonction du temps de stockage	45
10	Effet comparatif du DMSO sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation	47
11	Effet comparatif du glycérol sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation	48
12	Effet comparatif du saccharose sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation	48

Liste des Tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Constitution des échantillons expérimentaux	33
II	Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin	34
III	Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche	36
VI	Taux de survie de la souche après concentration, en l'absence (témoins) en la présence de cryoprotecteurs	42

Résumé (Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin)

Les ferments lactiques utilisés dans le secteur agro-alimentaire sont fournis aux utilisateurs sous trois formes physiques, liquide, congelée ou lyophilisée. Pour des raisons de faciliter la conservation, le transport et l'utilisation de ces ferments, la forme liquide a été largement supplantée par les formes congelées et lyophilisées. Afin de réduire les effets nocifs de ces deux traitements de conservation sur les souches, on utilise les cryoprotecteurs. Par ailleurs, le lait camelin connaît ces dernières années un regain d'intérêt vu sa composition équilibrée en nutriments de base et surtout les allégations « santé » qui lui sont attribuées. Récemment, les laiteries implantées dans le sud est de l'Algérie, à Ghardaïa, commencent à s'intéresser à ce bioproduit et aux possibilités de le conserver en recourant à sa transformation en produits dérivés. Dans ce contexte, cette étude vise une ébauche de création d'un soucier, par l'isolement d'une « souche d'intérêt » (*Streptococcus thermophilus*) à partir du lait camelin et l'optimisation des conditions de sa conservation durant deux mois. Pour se faire, nous l'avons concentrée par congélation et par lyophilisation en utilisant des cryoprotecteurs : le DMSO, le glycérol et le saccharose. Les résultats obtenus indiquent que ces trois cryoprotecteurs améliorent le taux de survie de la souche acidifiante, par rapport aux témoins, concentrés sans addition de cryoprotecteurs. Parallèlement, l'étude montre que les échantillons lyophilisés contenant du saccharose résistent mieux aux traitements de conservation, puisque leur taux de survie après deux mois d'entreposage est égal à 99,20%.

Mots clé : Lait, chamelle, *Streptococcus thermophilus*, congélation, lyophilisation, cryoprotecteurs.

Abstract (Effects of some cryoprotectants on the conservation of strain of interest was isolated from camel milk)

The lactic acid bacteria used in the food industry are provided to users in three physical forms, liquid, frozen or lyophilized. For reasons of ease of storage, transport and use, the liquid form has been largely supplanted by the frozen and lyophilized forms. To reduce the harmful effects of these two conservation treatments on the stem, Are used cryoprotectants. In addition, the camel milk known in recent years a resurgence of interest seen the balanced composition of nutrients and especially the basic claims "health" assigned. Recently, dairies located in the south east of Algeria, Ghardaia, beginning to address this bioproduct and opportunities to keep using its transformation into products. In this context, this study is an outline for creating a Souchier by the isolation of a "strain of interest" (*Streptococcus thermophilus*) from camel milk and optimization of conditions for its conservation for two months . To do so, we have concentrated by freezing and lyophilization using cryoprotectants: DMSO, glycerol and sucrose. The results indicate that these three cryoprotectants improve the survival rate of acidifying strain, compared with controls, without the addition of concentrated cryoprotectants. Meanwhile, the study shows that the freeze-dried samples containing sucrose are more resistant to preservation treatments, since their survival rate after two months of storage is equal to 99.20%.

Key words: milk, camel, *Streptococcus thermophilus*, freezing, lyophilization, cryoprotectant.

ملخص (آثار بعض cryoprotectants على المحافظة على سلالة هامة تم عزلها من حليب النوق)
يتم توفير بكتيريا حمض اللاكتيك المستخدمة في صناعة المواد الغذائية للمستخدمين في ثلاثة أشكال سائلة أو مجمدة أو مجففة بالتجميد. لأسباب سهولة النقل والتخزين والاستخدام ، قد حل محل النموذج السائل إلى حد كبير من الأشكال المجمدة والمجففة بالتجميد. للحد من الآثار الضارة لهذين العلاجين على السلالة تستخدم cryoprotectants. بالإضافة إلى ذلك ، وحليب الإبل قد شهد في السنوات الأخيرة تجدد الاهتمام نظرا لتكوينه المتوازن من المواد الغذائية الأساسية وخاصة متطلبات "الصحة" المعينة. مؤخرا ، منتجات الألبان الواقعة في الجنوب الشرقي من الجزائر بغرداية، بدأت في معالجة هذا المنتج الحيوي والفرص المتاحة لحفظه وذلك بالقيام بتحويله الى منتجاته المشتقة. في هذا السياق، فإن هذه الدراسة هي الخطوات العريضة لخلق Souchier بعزل "سلالة مهمة" (*Streptococcus thermophilus*) من حليب النوق وتحسين الظروف لصيانتها لمدة شهرين. للقيام بذلك، لقد خفضناها بالتجميد و التجفيف بالتجميد باستخدام DMSO الجلسرول والسكروز. وتشير النتائج إلى أن هذه cryoprotectants تحسن معدل البقاء على قيد الحياة من سلالة المحمضة، مقارنة مع الشواهد المركزة من دون إضافة cryoprotectants وفي الوقت نفسه ، تظهر الدراسة أن العينات المجففة بالتجميد تحتوي على السكروز هي أكثر مقاومة للعلاجات المحافظة، حيث معدل البقاء على قيد الحياة بعد شهرين من التخزين تساوي 99.20%.

الكلمات المفاتيح: حليب، الناقة، *Streptococcus thermophilus* ، التجميد، التجفيف بالتجميد، cryoprotecteurs.

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels (CHAMMAS *et al.*, 2006 ; ZAMFIR *et al.*, 2006).

La microflore du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (Yaourt, fromage...). De nombreuses études montrent que les produits laitiers préparés traditionnellement à partir du lait cru ont des saveurs typiques et des qualités nutritionnelles de plus en plus recherchées par le consommateur (CHAMMAS *et al.*, 2006 ; PATRIGNAANI *et al.*, 2006).

Les ferments lactiques utilisés dans le domaine agro-alimentaire sont généralement fournis aux utilisateurs sous trois formes physiques : liquide, congelée ou lyophilisée (TAMIME et ROBINSON, 1999). Pour des raisons de facilité de conservation, de transport et d'utilisation, la forme liquide a été largement supplantée par les formes congelées et lyophilisées. Afin de réduire les effets nocifs de ces traitements de conservation sur les souches, on utilise les cryoprotecteurs dont les plus appliqués à l'échelle industrielle sont le lactose et le saccharose, le glutamate monosodique, l'ascorbate de sodium et le glycérol (MÄYRÄ- MÄKINEN et BIGRET, 1998). Dans ce contexte FONSECA *et al* (2000) ont montré que l'ajout du glycérol a permis également d'obtenir une meilleure résistance des bactéries lactiques au stockage sous forme congelée.

Nous nous sommes intéressés dans la présente étude, au lait de chamelle qui représente une source alimentaire importante pour les sociétés pastorales nomades. Son intérêt particulier tient au fait qu'il présente une grande originalité dans sa composition tant qualitative que quantitative, en matières protéiques, en lipides, en minéraux et en vitamines.

Il est le plus souvent consommé à l'état frais. La préoccupation majeure des laitiers et des technologues est de pouvoir transformer les excédants de lait camelin en produits dérivés présentant des qualités satisfaisantes. Cette transformation nécessite, une bonne connaissance de la microflore de ce bioproduit. Les bactéries lactiques du lait de chamelle sont toutefois, peu décrites dans la littérature (KARAM et ZADI KARAM, 2006). La présente étude s'inscrit dans ce cadre. Elle vise une ébauche de création d'un soucier camelin. Ce soucier serait d'un grand intérêt pour des Laitiers nouvellement implantés dans les zones arides et qui

traitent le lait camelin. En effet l'existence d'un soucier au niveau d'une usine de transformation du lait permet d'assurer une meilleure régularité des fabrications et une réalisation en routine de l'ensemencement direct du lait. Il existe deux méthodes essentielles de conservation des souches : la congélation et la lyophilisation. Toutefois celles-ci affectent souvent la viabilité des souches d'intérêt, en l'occurrence les souches acidifiantes et/ou les souches aromatisantes, si certaines précautions ne sont pas prises. Parmi les nombreux facteurs qui interviennent efficacement sur la survie des souches, l'addition de cryoprotecteurs au milieu de conservation. Ces substances permettent aux cellules bactériennes de mieux supporter les basses températures lors des traitements de conservation et/ou lors du stockage.

L'objectif assigné au présent travail, vise à isoler une souche d'intérêt à partir du lait camelin et de procéder à sa concentration selon les deux méthodes précédemment citées.

L'étude comporte deux parties complémentaires:

- Isolement sur milieu sélectif d'une souche acidifiante à partir de lait camelin cru ;
- suivi de l'évolution quantitative de la souche concentrée par congélation ou par lyophilisation, en présence et en absence de trois cryoprotecteurs, durant deux mois d'entreposage.

I. Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1.1 Le dromadaire

En milieu aride le dromadaire est un animal domestiqué, au même titre que d'autres ruminants (zébu, mouton, chèvre) et des chevaux et des ânes, pour ses productions. Sa contribution aux ressources d'un milieu à faible productivité, ses mises-bas, son lait, sa viande et son travail sont très appréciés par son éleveur, dont la vie en dépend dans le milieu désertique (FAYE, 1997).

Les caractéristiques anatomiques des camélidés les classent dans une famille zoologique bien définie et différente de celle des bovidés. La famille des camélidés appartient à l'embranchement des vertébrés, classe des mammifères ongulés et sous classe des placentaires. Dépourvus de cornes et de vésicule biliaire, CUVIER (1835) classait les camélidés dans le sous-ordre des ruminants. Les zoologues américains mettaient le dromadaire dans la classe des mammifères ongulés, ordre des Diplathra (articulation double) et sous-ordre des Artiodactyles (doigts pairs) (PRAT, 1993).

Cette famille du sous-ordre des ruminants ne comprend que deux genres : *Camelus* et *Lama*.

Le genre *Camelus* comprend 2 espèces :

Camelus bactrianus (chameau de Bactriane) chameau à deux bosses

Camelus dromedarius (dromadaire) chameau à une bosse.

D'après la classification établie par MUKASA-MUGERWA (1985). Le dromadaire appartient à la :

Classe Mammifères

Sous-classe des Placentaires

Ordres des Artiodactyles

Sous ordres des Ruminants

Famille des camylidae

Groupe des Tylopodes

Genre *Camelus*

Espèce *Camelus dromedarius*

GAUTHIER-PILTERS (1981) rapporte que les ancêtres des camélidés actuels apparaissent au tertiaire en Amérique du nord. D'après YAGIL (1984), ces proto-camélidés migrèrent d'Amérique du nord vers les autres parties du monde et s'éteignirent dans leur lieu d'origine.

Le dromadaire ou son ancêtre très proche serait arrivé, il y a 2 ou 3 millions d'années, en Afrique par le Sinaï, occupant la Corne de l'Afrique puis l'Afrique du nord jusqu'à l'Atlantique (CORRERA, 2006).

Cet animal est le mieux adapté aux régions chaudes à climat subdésertique et désertique des domaines méditerranéen, tropical et subtropical. Ces régions sont caractérisées par la rareté de l'eau et par une végétation spontanée éparse (PEYRE DE FABREGUES, 1989).

1.1.1 Alimentation du dromadaire

Les pâturages sahariens sont classés en 2 catégories: les pâturages permanents et les pâturages éphémères.

- Les plantes vivaces, charnues très résistantes à la sécheresse dont les feuilles sont réduites à l'état d'articles ou d'épines. Cette végétation spéciale forme le fond de la nourriture de dromadaire que les nomades appellent le « bois ». Elles constituent le pâturage permanent du dromadaire ;
- les petites plantes annuelles et éphémères formées principalement de composées, de crucifères, de graminées, de légumineuses, de malvacées, de Géraniacées et de résédacées qui germent après les pluies dans les endroits qui paraissent en temps habituel les plus impropres à la végétation (LONGO *et al.*, 1989).

1.1.2 Importance du dromadaire

Le dromadaire joue un rôle socio-économique primordial dans les sociétés pastorales nomades dont il fournit des ressources alimentaires appréciables par sa viande, sa graisse, son lait. Ses urines ont un rôle thérapeutique en servant au traitement de certaines maladies. Sa peau, sa laine constituent des matières premières pour l'artisanat. Avec les excréments du dromadaire, les pasteurs font du feu et/ou préparent des pansements. Ces excréments constituent également des fertilisants naturels pour les parcours pastoraux (LHOTE, 1987 ; DIALLO, 1989 ; COTTIN, 2000). Mais son emploi essentiel est de servir de monture (selle), de tracter des charrues plus particulièrement sur les terrains sablonneux. Sa force est aussi mise à profit pour puiser l'eau des puits, (DIALLO, 1989) et pour le bât. Enfin, il assure des communications régulières entre les différents groupes humains, contribuant ainsi à faire sortir de l'isolement total un pays, ce qui lui a valu d'être surnommé le "vaisseau du désert" par plusieurs auteurs dont PEYRE DE FABREGUES (1989).

1.1.3 Répartition géographique

Le dromadaire est répertorié dans 35 pays "originaires" qui s'étendent du Sénégal à l'Inde et du Kenya à la Turquie. Par contre, le chameau de Bactriane (à deux bosses) ne supporte pas la chaleur. Vers le nord son habitat ne connaît de limites que celles que lui impose l'absence de nourriture. Il n'est présent que dans une zone étroite localisée de la Turquie à la Chine et qui comprend à peine une dizaine de pays.

L'effectif est d'au moins 20 millions de "grands camélidés" (regroupant seulement les dromadaires et les chameaux) dont un peu plus d'un million de chameaux de Bactriane (FAYE, 2002). Près de 80 % de la population de dromadaires se situe en Afrique où l'essentiel des effectifs est concentré dans les pays de la Corne (Somalie, Ethiopie, et Djibouti, Kenya, Soudan) qui abritent environ 60 % du cheptel camélin mondial. La Somalie, à elle seule, avec ses 6 millions de dromadaires, possède près de 50 % du cheptel africain, ce qui lui vaut vraisemblablement l'appellation de "pays du chameau". L'économie cameline est également importante en Afrique de l'ouest notamment en Mauritanie où l'effectif est passé de 700 000 têtes en 1966 à 1.247 000 têtes en 2001 de. Le dromadaire a aussi été introduit dans d'autres régions comme l'Australie où il vit actuellement à l'état sauvage. Il y est essentiellement concentré dans les zones méridionale et occidentale du pays (FAYE, 1997).

Estimé à 268.560 têtes en 2005, l'effectif camélin algérien est réparti sur 17 wilayates, avec 75% du cheptel dans huit wilayates sahariennes : Ouargla, Ghardaïa, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Béchar et 25% du cheptel dans neuf wilayates steppiques : Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila (SIBOUKEUR, 2007).

1.1.4 Les races algériennes

Les différentes races rencontrées en Algérie se retrouvent dans les trois pays d'Afrique du Nord; ce sont des races de selle, de bât et de trait. Il s'agit des races suivantes: Le Chaambi L'Ouled Sidi Cheikh, le Saharaoui, l'Ait Khebbach, le Chameau de la Steppe, le Targui ou race des Touaregs du Nord, L'Aier, le Reguibi et le Chameau de l'Aftouh (BEN AISSA, 1989).

1.1.5 Production laitière

La production mondiale de lait de chamelle est estimée officiellement à 1,3 millions de tonnes en 2002. Cependant, si on tient compte de l'autoconsommation et du réel potentiel moyen des animaux en production, il est probable que cette production soit plus élevée (soit 5,4 millions de tonnes). Les productions individuelles varient entre 1000 et 2700 litres par lactation en Afrique, mais peuvent atteindre 7000 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 huit à 18 mois en général), soit des durées plus importantes en moyenne que les vaches laitières dans les mêmes conditions (FAYE., 2003). Cette variabilité des rendements laitiers observés est liée à celle de divers facteurs tels que la quantité et la qualité de l'alimentation disponible, conditions climatiques, fréquence de la

traite, rang de mise bas et l'état sanitaire. (YAGIL et ETZION., 1980 ; SIMPKIN et *al.*, 1997 ; ISMAIL et Al-MUTAIRI., 1998 ; KHANNA et *al.*, 1998).

1.2 Le lait de chamelle

Le lait de chamelle est beaucoup plus répandu et représente la ressource alimentaire la plus importante pour les sociétés pastorales nomades.

1.2.1 Composition et propriété physicochimique du lait

Le lait de dromadaire, à l'observation visuelle, est d'une couleur blanc mat, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène (SAWAYA *et al.*, 1989). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (ABDEL-RAHIM, 1987) et/ou amère (RAMET, 2003).

Le pH du lait camelin se situe autour de 6,6 et l'acidité est de l'ordre de 15° Dornic. Sa densité oscille entre 0,99 et 1,034 avec une viscosité moyenne de 2,2 centipoises (HASSAN *et al.*, 1987) et un point de congélation variant de $-0,53$ à $-0,61^{\circ}\text{C}$. Sa teneur en eau est de 87,3 (KAMOUN, 1994).

Le lait de dromadaire présente une grande originalité dans la composition fine et qualitative des matières protéique, des matières grasses et des matières minérales.

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) et 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, 1986; FARAH et RUEGG, 1989; MOHAMED *et al.*, 1990) en plus cet caséine 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) et l'équilibre entre fractions est caractéristique. 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.

Alors que la teneur en lactose fluctue entre 2,5 et 5,6%. Ces concentrations élevées observées pour ce dernier nutriment expliqueraient la saveur parfois sucrée du lait de chamelle (SIBOUKEUR., 2007).

La matière grasse est caractérisée par la dimension des globules gras; ceux-ci sont de petite taille; ils possèdent une enveloppe membranaire importante et apparaissent fortement liés aux protéines (KNOESS *et al.*, 1986; FARAH *et al.*, 1990), et une composition en acides gras pauvre en acides à courtes chaînes; la proportion en acides palmitique et stéarique est au contraire élevée. Les propriétés physiques des triglycérides se caractérisent par des points de fusion plus bas et de solidification plus élevés, que pour la matière grasse du lait de vache (ABU-LEIHA, 1987; FARAH et RUEGG, 1989).

Sa composition minérale diffère peu de celle du lait de vache (ELLOUZE et KAMOUN., 1989). Il ya toutefois un peu moins de sodium, de calcium et de phosphore, et plus de chlore et de potassium, mais il se caractérise néanmoins par des taux plus élevés en oligo-éléments (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Pb) (SAWAYA *et al.*, 1984 ; ELAMIN et WILCOX, 1992 ; BENGOUNI *et al.*, 1994 ; MEHAIA *et al.*, 1995)

La composition en vitamines du lait de dromadaire diffère de celle du lait de vache par une teneur en vitamine C supérieure; le taux de vitamine A est beaucoup plus faible et de plus très variable de 12,9 U.I. /100 g de lait (SAWAYA *et al.*, 1984) à 50,0 U.I./100 g . Il en est de même de la teneur en riboflavine et en vitamine B₁₂.

1.2.2 Propriété médicinale

Le lait de chamelle est supposé porteur de vertus diététiques et thérapeutiques qui en font un produit de qualité. En effet, traditionnellement, des propriétés antibiotiques, anti-infectieuses, anti-cancéreuses, antidiabétiques, des effets prophylactiques et reconstituants chez les malades en convalescence sont attribués au lait de chamelle. Au Kazakhstan, le lait de chamelle fermenté (shubat) est utilisé pour le traitement de la tuberculose, de la gastro-entérite, des ulcères gastriques et pour l'alimentation des nourrissons (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004). En Inde, (AGRAWAL *et al.*, 2003) ont montré l'effet hypoglycémiant et régulateur de la glycémie du lait de chamelle chez 12 diabétiques insulinodépendants buvant ce lait en plus de leur traitement. Cela s'est traduit par une diminution de la demande en insuline chez ces patients après trois mois de cure laitière.

Les facteurs «santé» attribués au lait de chamelle et ses produits transformés peuvent être liés à certains de ses composants:

1.2.2.1 Lactoferrine

La forte teneur des laits de camélidés en lactoferrine, une glycoprotéine qui possède une activité antimicrobienne, antivirale, anticancéreuse, anti-inflammatoire et analgésique pourrait être une des raisons des propriétés thérapeutiques du lait de chamelle et du shubat (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Le lysozyme

Le lysozyme est une protéine naturellement présente dans les laits de mammifères où il constitue un facteur antimicrobien puissant. La quantité de lysozyme dans le lait de chamelle est plus élevée que dans le lait de vache, 15 μg 100 ml⁻¹ contre 7 μg 100 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'œuf (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).

1.2.2.3 Immunoglobulines

Les IgG jouent un rôle dans le système immunitaire chez les nouveau-nés. Trois classes fonctionnelles d'IgG sont définies chez le dromadaire. Du point de vue structural, les IgG du dromadaire sont plus proches des immunoglobulines humaines que de celles des autres ruminants. 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. Par ailleurs, elles sont plus thermorésistantes: 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).

1.2.2.4 Lactoperoxydase

Les peroxydases sont des enzymes qui appartiennent aux systèmes non-immuns normaux de la défense du lait; 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 possède un PM de 78000 (ELAGAMY *et al.*, 1996). Par ailleurs, la lactoperoxydase du lait de dromadaire 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). Il possède encore une activité enzymatique à forte

température, alors même que la lactoperoxydase du lait de vache a perdu toute activité (LOISEAU *et al.*, 2001).

1.2.2.5 Vitamine C

La réputation du lait de chamelle est en grande partie due à sa richesse en vitamine C. 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. Il y a en moyenne trois fois plus de vitamine C dans le lait de chamelle que dans le lait de vache (ELKHIDIR, 2002).

La vitamine C joue un rôle biologique considérable par ses propriétés antioxydants. Récemment, 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).

1.2.2.6 L'insuline

L'amélioration du statut glycémique chez les diabétiques traités au lait de chamelle serait due à la présence d'insuline en quantité importante : plus 5000 fois la valeur observée chez la vache et 1000 fois la valeur observée chez la femme (52 UI/l). 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. En tout état de cause, il semble que la consommation régulière de lait de chamelle ait une action hypoglycémiant et régulatrice de la glycémie chez les patients insulinodépendants (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004).

1.2.3 Propriété technologique et produits fermentés

Comparé au lait de vache : le lait de chamelle est pauvre en caséines, protéines responsables de la consistance du lait coagulé et l'équilibre minéral de ce lait, en particulier, amplifie son inaptitude à la coagulation. Le lait de dromadaire offre une résistance plus marquée aux fermentations lactiques. La matière grasse du dromadaire est riche en acides gras insaturés et plus particulièrement en acide palmitoléique ce qui fait que le point de fusion de cette matière grasse est relativement bas. En plus de cela, la taille des globules gras est relativement petite. Ces différences, expliquent que le lait de dromadaire ne peut pas être transformé en yoghourt, fromage et beurre par l'application des diagrammes technologiques classiques. Les difficultés de transformation de ce lait seraient contournables par des adaptations technologiques couramment utilisées en industrie laitière pour corriger les laits (KAMOUN., 1995).

Pendant ces dernières décennies, les travaux menés sur ce lait ont permis de mieux cerner les difficultés et de les contourner en usant de quelques modifications des procédés utilisés. C'est

ainsi que des essais concluants de transformation du lait de chamelle en produits dérivés ont été rapportés par plusieurs auteurs, notamment pour la fabrication du lait en poudre (ABULEHIA, 1994), beurre (FARAH *et al*, 1989; RÜEGG et FARAH, 1991), fromage (KAMOUN et BERGAOUI, 1989 ; MOHAMED *et al*, 1990 ; KAMOUN, 1990 et 1995), yaourt ainsi que le lait fermenté (FARAH *et al*, 1990 ; ABU-TARBOUSH, 1996 et 1998) et crème glacée (ABULEHIA *et al*, 1987) (SIBOUKEUR, 2007).

En milieu pastoral, le lait de chamelle est très prisé à l'état frais. Il est aussi transformé en lait fermenté car l'obtention de beurre ou de fromage est très difficile. Pourtant FAYE (1997) rapporte que les Touareg du Mali et du Niger ont trouvé des présures spécifiques qui permettent la transformation du lait de chamelle en fromage. En Mauritanie, le lait chamelle pasteurisé et le fromage sont vendus dans les villes comme Nouakchott. Par contre Au Kazakhstan, les possibilités de garder les produits frais sont rares. Traditionnellement, on commercialise de préférence des produits laitiers fermentés. Le lait de vache fermenté en Asie centrale s'appelle aïran (ou kefir en russe), shubat au Kazakhstan, le chal et doïran au Turkménistan, le khoormog en Mongolie. Le koumis est le produit de la fermentation du lait de jument. Le lait de yak fermenté commercialisé au Kirghizistan s'appelle kourout. Il existe aussi une espèce de fromage dur dénommé kourt (KONUSPYEVA *et al.*, 2003). Tous ces dérivés laitiers nécessitent l'utilisation des ferments lactiques pour leurs fabrication.

1.3 Les ferments lactiques

1.3.1 Découverte des bactéries lactiques

Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des bactéries lactiques, elles avaient été utilisées dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (PAUL ROSSE *et al.*, 2002). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. STORCH (1890), CONN (1889) et WEIGMANN (1896) ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (De ROISSART et LUQUET, 1994).

1.3.2 Définition et caractéristiques principale

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Ce groupe de bactéries, regroupe des bacilles et des coques. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement GRAM positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoleérantes, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ont des

exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (AXELSSON., 1998 ; HOLZAPFEL et *al.*, 2001 ; GEVERS, 2002).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes),
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),
- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (VANDAMM et *al.*, 1996).

Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (figure 1) (De ROISSART et LUQUET, 1994).

Du fait de l'amplitude de cette définition, plusieurs genres de bactéries appartiennent à cette famille : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella* (POT, 2008). Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments (VANDAMME et *al.*, 1996 ; GEVERS, 2002 ; PATRIGNANI et *al.*, 2006).

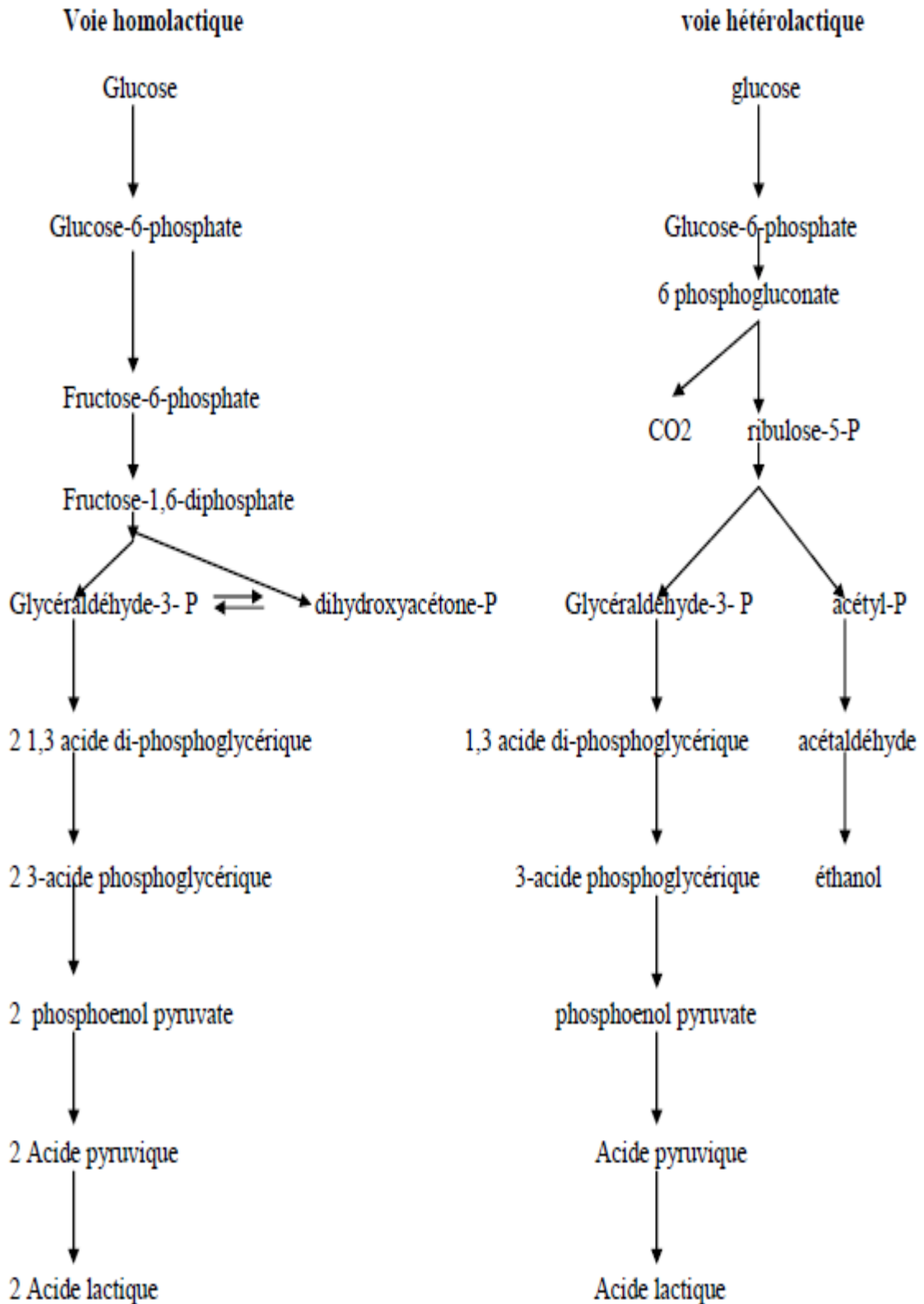


Figure 1 : Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De ROISSART et LUQUET, 1994).

1.3.3 Applications

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (AXELSSON, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle. Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (DALY *et al.*, 1998 ; HUGENHOLTZ *et al.*, 2002). la fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (MAYRA-MAKINEM et BIGRET, 1998). Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002 ; WISSELINK *et al.*, 2002). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (RODRIGUEZ *et al.*, 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (LANGELLA *et al.*, 2001).

1.3.4 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées

L'utilisation des bactéries lactiques ou probiotiques pour une application industrielle donnée, est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes :

1.3.4.1 Activité acidifiante

La transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (FRANK et HASSAN, 1998 ; MAYRA-MAKIEN et BIGRET, 1998).

1.3.4.2 Production de métabolites d'intérêt

Selon les espèces et selon les souches, les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites tels que l'acide acétique, l'éthanol, des arômes (diacétyl, acétaldéhyde...), des bactériocines (activité antimicrobienne), des exo-polysaccharides, des enzymes (protéases, peptidases, lipases...) et du CO₂ (formation d'ouvertures dans les fromages) (BEAL et al., 2008 ; FRANK et HASSAN, 1998 ; MAYRA-MAKIEN et BIGRET, 1998) ;

1.3.4.3 Propriétés enzymatiques

Les activités protéolytiques et peptidasique sont importantes car elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu. L'activité lyolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (BEAL et al., 2008) ;

1.3.4.4 Propriétés spécifiques aux probiotiques

En plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (DA CRUZ et al., 2007 ; OUWEHAND et al., 2002). De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche, principalement en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques ;

1.3.4.5 Critères de performance

Indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité, éthanol, chlorure de sodium) (BEAL et al., 2008).

1.3.5 Microbiologie du lait camelin et ces dérivés

Des analyses microbiologiques de lait de chamelle du Sud- Ouest algérien ont montré que les genres bactériens rencontrés étaient représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Parmi les coques homofermentaires des souches s'apparentent à *Enterococcus faecalis* et des souches s'apparentent à *Lactococcus*. Ces dernières, qui résistaient à 6,5% de NaCl, ce qui les distingue des espèces habituellement décrites dans la littérature, ont été identifiées à *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Les coques lactiques hétérofermentaires appartenait aux espèces *Leuconostoc dextranicum* et *Leuconostoc lactis*. Les lactobacilles identifiés appartenait tous à l'espèce *Lactobacillus plantarum* (ZADI KARAM et KARAM., 2006).

HASSAINE et al., 2008 ont aussi analysés le contenu bactérien du lait de chamelle cru de trois races de dromadaire au sud algérien (Réguibi, Targui, N'ajjer) et ont pu identifiés les espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*

faecium, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Trois bactéries lactiques nommées *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* et *Lactococcus lactis subsp. lactis* avec un potentiel probiotique ont été isolés à partir du lait camelin pasteurisé au Kuwait (YATEEM et al., 2008).

L'analyse de la qualité microbiologique du Garris, produit fermenté domestique soudanais de lait de chamelle, a permis d'isoler et d'identifier les souches appartenant aux genres suivant : *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Ces souches sont *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* (ABDEL MONEIM et al., 2006).

Une analyse microbiologique de lait de dromadaire produit au Maroc a permis de caractériser des bactéries lactiques suivantes : *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus plantarum* (KHEDID et al., 2009).

Par ailleurs, des analyses microbiologiques récentes du shubat réalisées au CIRAD, ont montré que huit souches bactériennes appartenant à quatre types de bactéries lactiques intervenaient de façon différenciée sur la fermentation du lait de chamelle: *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*. Ces résultats laissent penser qu'il est possible de piloter les processus fermentaires pour obtenir des produits différenciés mieux standardisés (AUSSEL, 2002).

1.3.6 *Streptococcus thermophilus*

Selon (BERGEY., 2004), le genre streptocoque est classé en (06) catégories :

- Streptocoques pyogènes ;
- Streptocoques fécaux ;
- Streptocoques oraux
- Streptocoques lactiques ou lactocoques du groupe sérologique N, faiblement hémolytiques, mais jamais pathogènes ;
- Streptocoques anaérobies stricts ;
- autres Streptocoques de groupe sérologique inconnu, hétérogènes, faiblement ou non hémolytique, parmi lesquels on trouve l'espèce non pathogène *Streptococcus thermophilus*.

1.3.6.1 Caractéristiques de *Streptococcus thermophilus* Ce sont des cocci à GRAM positif. Ils appartiennent au groupe viridans du genre *Streptococcus* (MALONGA, 1985). Ils se présentent sous forme de cellules sphériques ovoïdes de (0,7 à 0,9 nm de diamètre) en paires, en chaînettes ou en longues chaînes (TERRE, 1986) (figure 2).



Figure 2 : *Streptococcus thermophilus* (BOUDJEMAA, 2008)

En milieu gélosé M17, ils forment des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre. Leur sensibilité aux antibiotiques est grande (MALONGA., 1985).

Streptococcus thermophilus représente l'une des espèces les plus thermorésistantes, car elle survit à 65°C pendant 30min (BOURGEOIS et LARPENT, 1996). Elle est halotolérante (2-4% de NaCl) et homofermentaire en produisant exclusivement de l'acide lactique. Elle dégrade le lactose et le saccharose mais attaque aussi le fructose et le glucose (TORRIANI et al., 1997). Cette espèce est capable de synthétiser les exopolysaccharides (EPS) soit en monoculture, soit en association avec la souche *Lactobacillus bulgaricus* (NOVEL, 1993). Elle possède une β galactosidase active en présence de cations monovalents ou divalents Mg^{+2} , Mn^{+2} (DESMAZEAUD, 1990). Elle se trouve dans le lait et les produits laitiers. L'absence d'antigène de groupe sérologique, caractérise également cette espèce (ACCOLAS et al., 1980).

-Elle contient environ 40% de GC dans son ADN (TERRE, 1986).

- Elle possède un caractère thermophile accusé. Sa température de croissance se situe entre 37 °C et 45°C. Elle ne croit pas à 10°C, ce qui la distingue des autres streptocoques (ACCOLAS et al., 1980).

Son activité protéolytique est faible, et la plupart des acides aminés libérés sont utilisés pendant la phase exponentielle de croissance (MALONGA., 1985).

L'espèce *Streptococcus thermophilus* fait parti des levains thermophiles (yaourts, fromage à pâte cuite) qui dégradent plus rapidement la κ -caséine que l' α_{s1} - caséine ou β - caséine.

Les ferments lactiques thermophiles comme *Streptococcus thermophilus* excrètent de l'acétaldéhyde à partir de certains acides aminés comme la thréonine issue de la protéolyse.

Contrairement aux espèces, *Streptococcus salvarius subsp thermophilu* et *Streptococcus salvarius subsp thermophilus*, elle ne se développe pas symbiotiquement avec *Lactobacillus bulgaricus*. Elle ne produit pas d'aromes volatils (acétaldéhyde et diacétyl) et ne stimule pas la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* (BOURGEOIS et LARPENT, 1996).

Streptococcus thermophilus possède un temps de génération g entre 0,5 et 0,7 h et un taux de croissance μ oscillant entre 1,0 et 1,4 h⁻¹ (De ROISSART et LUQUET., 2004).

1.3.7 Utilisation industrielle des ferments lactiques

Historiquement, l'utilisation industrielle des ferments lactiques se faisait grâce à la technique du « pied de cuve », où une partie du produit fermenté était conservée pour ensemercer les fermentations suivantes. La nécessité d'un contrôle plus précis du procédé de fabrication et de la qualité finale du produit, ajoutée à une meilleure connaissance des propriétés technologiques des souches, a permis de développer, à partir des années 1920, la méthode d'ensemencement par précultures (LEJARD *et al.*, 1994). A partir d'un échantillon liquide et en respectant les étapes successives de propagation, le ferment est multiplié jusqu'au volume nécessaire pour l'inoculation du produit. Cette méthode a permis une amélioration significative dans la conduite du procédé et la standardisation du produit final, par comparaison à la méthode du pied de cuve. Par contre, elle présente des inconvénients, concernant le risque de contamination des cultures et de mutation des souches. De plus, son coût est élevé, car elle nécessite un personnel spécialisé ainsi que des installations permettant de faire le « scale up » des précultures (BEAL *et al.*, 2008 ; SMITH, 2001 ; TAMIME et ROBINSON, 1999). De plus, selon (TAMIME et ROBINSON, 1999), cette méthode n'est pas appropriée dans le cas d'utilisation de cultures mixtes, car le maintien des proportions entre les souches est difficile.

Les ferments lactiques ont été produits pour la première fois sous forme concentrée et congelée au cours des années 1965-1970, et commercialisés, sur le marché américain, par les Compagnies Boll-Hansen et Marshall-Miles (MARUEJOULS et CAIGNIET, 1983), permettant ainsi l'ensemencement semi-directe ou directe des cuves de fabrication. Ce type de ferment a commencé à être produit, en France, à partir de 1978 par les sociétés BOLL-HANSEN et EUROZYME (MARUEJOULS et CAIGNIET, 1983).

1.3.8 Avantages de l'utilisation des ferments concentrés

Selon, MAYRA-MAKIEN et BIGRET, 1998 ; BEAL et *al.*, 2008), les avantages de l'utilisation des ferments concentrés se résument ainsi :

- simplicité de leur utilisation ;
- amélioration du contrôle de la fabrication ;
- obtention de produits plus réguliers, due à la standardisation des cinétiques d'acidification, la régularité et la reproductibilité des productions ;
- limitation des risques de contamination et des infections phagiques ;
- flexibilité de l'organisation de la fabrication ;
- réduction et meilleure maîtrise des coûts de production ;
- possibilité de réalisation de mélanges précis entre les souches.

1.4 Conservation et formes commerciales des ferments lactiques

Les ferments lactiques utilisés dans le domaine agro-alimentaire, sont généralement fournis aux utilisateurs sous trois formes physiques : liquide, congelée ou lyophilisée (TAMIME et ROBINSON, 1999).

Pour des raisons de facilité de conservation, de transport et d'utilisation, la forme liquide a été largement supplantée par les formes congelées et lyophilisées. Ces dernières réduisent en effet le nombre de cultures intermédiaires en usine. Les ferments liquides restent, cependant, encore utilisés par certaines fromageries (BEAL et *al.*, 2008).

La lyophilisation est une technique de stabilisation qui permet le stockage des bactéries à 4 °C ou -18 °C. L'intérêt de la lyophilisation des ferments lactiques est lié au fait que, grâce à la réduction de volume par rapport aux bactéries congelées, les coûts de stockage et de transport sont inférieurs. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours et sont plus facilement manipulables. Cependant, la lyophilisation implique des étapes et des équipements supplémentaires par rapport à la congélation, ce qui la rend plus coûteuse. De plus, cette technique n'est pas applicable à tous les ferments, en raison de l'importante sensibilité de certaines bactéries à la déshydratation.

1.4.1 Congélation

La congélation est actuellement la technique de conservation des bactéries lactiques la plus utilisée dans le domaine agro-alimentaire. Une bonne maîtrise de cette opération est nécessaire pour éviter ou minimiser les pertes de viabilité liées à l'abaissement de la température et à la formation de glace au cours de la congélation. Par rapport à la lyophilisation, elle permet une reprise d'activité plus rapide des ferments et présente un coût de fabrication inférieur à celui des ferments lyophilisés. Cependant, elle induit aussi des

pertes de viabilité, inégalement maîtrisées jusqu'à présent. De plus, les ferments congelés nécessitent une attention spéciale par rapport au maintien de la chaîne du froid lors de leur transport et leur stockage. Il est aussi préconisé que les bactéries congelées soient stockées à des températures inférieures à -45 °C, afin d'assurer la stabilité de la qualité et de l'activité des ferments (STREIT., 2008). Cependant la congélation à une température de -20°C permet une conservation de la plus part des microorganismes pendant 1 à 2 ans et le métabolisme de ces derniers en dessous de -18°C est totalement inhibé (LARPENT, 1997).

1.4.2 Lyophilisation

La technique consiste à éliminer l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux (De BEER et *al.*, 2006). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur, ou piège. Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur (CHOUVENC et *al.*, 2004). La lyophilisation comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire.

1.4.2.1 Lyophilisation des bactéries lactiques

La lyophilisation s'est développée pendant la seconde guerre mondiale pour le stockage du plasma sanguin (PEGG, 2002). Ainsi, pour des vaccins comme pour un grand nombre de médicaments et de micro-organismes, la lyophilisation est la seule technique permettant une conservation à long terme des principes actifs à l'état sec (TANG et PIKAL, 2004). Dans le domaine des industries alimentaires, les ferments lactiques (probiotiques et starters) sont de plus en plus utilisés sous la forme lyophilisée (PEGG, 2002).

1.4.2.2 Description et principes de la lyophilisation

La première phase de l'opération consiste à congeler le produit, c'est-à-dire à amener l'eau qu'il contient à l'état solide ; ceci implique de lui soustraire de l'énergie. La seconde phase consiste à extraire l'eau du produit par volatilisation en lui fournissant de l'énergie thermique (SHALAEV et *al.*, 2002). Cette seconde opération se déroule dans une enceinte où règne une pression très largement inférieure à la pression atmosphérique (de l'ordre de 0,1 à 1 mBar).

1.4.2.2.1 Congélation

Au cours de la congélation, la solution liquide de départ est supposée homogène, une partie de l'eau se sépare des substances dissoutes pour cristalliser à l'état pur. Le reste de l'eau se solidifie ensuite peu à peu en mélange avec les solutés pour former une matière interstitielle

(entre les cristaux de glace) qui adopte une structure amorphe (non cristalline ou vitreuse) (SIMATOS *et al.*, 1994). En général, à partir d'une solution complexe, les substances dissoutes ne cristallisent pas (SCHUCKH *et al.*, 2004). Un paramètre important à prendre en compte pour l'étape de la congélation est la vitesse de congélation qui conditionne la dimension des cristaux de glace. En effet, plus les cristaux de glace formés sont grands, plus le diamètre des pores est important, et par conséquent, plus la vitesse de dessiccation est élevée. Il est donc important du point de vue technologique, de produire de petits cristaux de glace par une congélation rapide conduisant à l'obtention de petits cristaux intracellulaires non dommageables pour les cellules (De ANGELIS et GOBBETTI, 2004).

1.4.2.2 Dessiccation

Elle se déroule en deux temps : d'abord la sublimation de l'eau cristallisée (séchage primaire, l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux), puis la phase de désorption et d'évaporation de l'eau liée qui a adopté lors de la congélation, une forme non cristalline ou vitreuse (séchage secondaire). Celle-ci résulte de la solidification sans réarrangement des molécules en raison de la très grande augmentation de la viscosité (CAILLET *et al.*, 2007). Ces états (cristallin et vitreux) peuvent coexister dans des proportions variables pour un même échantillon, la proportion d'eau à l'état vitreux étant d'autant plus grande que la vitesse de congélation et la viscosité sont grandes (HAUSMAN *et al.*, 2005). Les cavités laissées par les cristaux après la sublimation de l'eau confèrent la porosité nécessaire à l'évaporation de l'eau située dans l'espace interstitiel (FONSECA et CORRIEU, 2001).

1.4.3 Cryoprotection des bactéries lactiques

Il existe des substances protectrices qui permettent aux cellules de mieux supporter une congélation ou une décongélation lentes et un stockage à température supérieure à - 50°C appelées cryoprotecteurs (FONSECA et CORRIEU, 2001). Ces substances, qui doivent être peu volatiles, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique, ont des origines diverses : polyols (glycérol, sorbitol), sucres (lactose, saccharose), protéines lactières (lait écrémé, caséines), acides aminés (glutamate), antioxydants (ascorbate) ou macromolécules (maltodextrines) (BEAL *et al.*, 2008).

Les bactéries contiennent naturellement des cryoprotecteurs : les **sucres** (sucrose et le tréhalose), chez les bactéries GRAM+ (BERT *et al.*, 1998) ; les **polyols** (glycérol, sorbitol, et mannitol), que l'on retrouve chez les algues, les champignons, les levures, les plantes et certains bactéries (KETS *et al.*, 1996; HANS *et al.*, 1995), les **acides aminés et dérivés** (bétaine et carnitine), chez plusieurs groupes de bactéries (CSONKA, 1989) et l'acide tetrahydroxypyrimidine carboxylique (hydroxyectoïne) chez les bactéries halophiliques (Del

MORAL *et al.*, 1994), le glutamate, la glutamine, la proline et l'alanine chez *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* et d'autres micro-organismes (JEWELL *et al.*, 1991) et les acides aminés bêta chez les bactéries méthanogènes (LAI *et al.*, 1991).

Les cryoprotecteurs sont groupés en deux classes :

- Cryoprotecteurs intracellulaires : ce sont des substances de faible poids moléculaire (< 100) qui pénètrent à l'intérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration de l'ordre de la mole/l et agissent principalement lors d'une congélation lente. Le plus important représentant de cette catégorie, est le glycérol, mais on trouve aussi le diméthyle sulfoxyde, méthanol éthanol, polyéthylène oxyde, diméthylacétamide 1-2 propanediol.
- Cryoprotecteurs extracellulaires : ce sont des substances de haut poids moléculaire (>10.000) qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Ils sont utilisés à une concentration plus faible, de l'ordre de la milli-mole/l, et sont indiqués lors des congélations rapides. Parmi les molécules les plus utilisées de cette catégorie se trouvent le lactose, le saccharose, le tréhalose, la maltodextrine, polyvinyl pyrrolidone, le dextrane et l'amidon (De ROISSART et LUQUET, 1994; STREIT., 2008).

1.4.3.1 Mécanisme d'action des cryoprotecteurs

Les mécanismes de la cryoprotection sont l'objet de nombreuses études de nos jours. Les modes d'action les plus probables sont : un accroissement du volume de la phase liquide interstitielle, à une température donnée, par dépression du point de congélation commençante et donc réduction des effets liés à un refroidissement lent ; une diminution de la taille des cristaux de glace par abaissement de la température de nucléation et une réduction de leur vitesse de croissance et une stabilisation de la configuration native des protéines (LESLIE *et al.*, 1995). Lorsque les premiers cristaux de glace apparaissent, les CPE se concentrent uniquement à l'extérieur des cellules, contrairement aux autres solutés qui se concentrent à l'intérieur et l'extérieur des cellules. La perte d'eau des cellules conduit donc à une concentration en autre soluté, plus faible qu'en absence de CPE, minimisant ainsi les effets de l'accroissement de concentration de la solution interstitielle. Au niveau des membranes cellulaires séchées, des sucres comme le tréhalose et le saccharose peuvent remplacer les molécules d'eau dans leur liaison avec les groupes polaires des phospholipides empêchant ainsi les dommages durant la réhydratation (LESLIE *et al.*, 1995). Le tréhalose et le saccharose stabilisent la structure des protéines intracellulaires par ce phénomène de remplacement de l'eau (CARPENTER *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que les cryoprotecteurs étaient indispensables lors de la congélation quelles que soient les courbes de refroidissement. Tous les cryoprotecteurs ne pénètrent pas dans les cellules. Il est d'usage de

les séparer en cryoprotecteurs non diffusants (la plupart des sucres ajoutés) et diffusants (le glycérol, l'éthylène glycol, par exemple) (PEGG et DIAPER, 1988). Les cryoprotecteurs diffusants vont se substituer à une partie de l'eau intracellulaire et permettre ainsi une déshydratation partielle des cellules en plus de limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire. Ils réduisent également la vitesse de croissance de ces cristaux, abaissent la température de solidification de l'eau intracellulaire, tel un « antigel », et modifient la forme des cristaux de glace (HEY et MACFARLANE, 1998 ; PALASZ et et MAPJETOFT , 1996). Quand aux cryoprotecteurs pénétrants, ils protègent aussi au cours de la congélation et de la décongélation en réduisant la taille des cristaux de glace et en induisant des formes de cristaux moins traumatisantes. Ils permettent, via l'augmentation de la viscosité du milieu, la diminution de la rapidité des mouvements de l'eau et de chocs osmotiques importants. De plus, ils permettent, via l'augmentation de la pression osmotique, la réduction de la quantité de cryoprotecteurs pénétrants, nécessaires à une bonne conservation (MERYMAN, 1974).

II. Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

2.1 Matériel d'étude

2.1.1. Lait camelin

Les échantillons de lait utilisés proviennent de troupeaux de chameelles (race Sahrawi) de la région de Ghardaïa. Le lait est traité à partir de chameelles saines. Il est recueilli dans de bonnes conditions hygiéniques. Les échantillons de lait sont mis dans des flacons préalablement stérilisés, conservés et transportés dans une glacière au laboratoire où ils sont analysés.

2.1.2 Milieux de culture

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle les microorganismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire aux exigences nutritives du microorganisme étudié, ce qui implique qu'il couvre les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance et qu'il apporte la source de carbone et d'azote et de l'énergie. Il doit présenter un pH voisin du pH optimal de la croissance de l'espèce considérée (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

Milieu M17

Le bouillon M17 a été mis au point pour la culture et dénombrement des lactocoques dans le lait et les produits laitiers. Il favorise la culture des mutants incapables de fermenter le lactose. Il est bien adapté à la culture de l'espèce *Lactococcus lactis* qui est un microorganisme particulièrement exigeant.

TERZAGHI et SANDINE ont montré que l'incorporation de β -glycérophosphate de sodium à un milieu M16 permettait d'accroître le pouvoir tampon du milieu. Le nouveau milieu obtenu, dénommé M 17, a permis d'augmenter le développement des streptocoques lactiques qui sont des microorganismes produisant d'importantes quantités d'acide par utilisation homofermentative du lactose.

Les peptones de, caséine, de viande et de soja, contiennent les sources de carbone et d'azote nécessaires à la culture des lactocoques. L'extrait de levure est une source de vitamines du groupe B. L'acide ascorbique agit comme stimulateur de croissance. Le lactose est fermenté en acide lactique. Celui-ci est progressivement neutralisé par le glycérophosphate de sodium afin que soit stabilisé le pH du milieu (TERZAGHI et SANDINE, 1975 ; ANONYME 3, 2003 ; ANONYME 4, 2004). La composition de ce milieu de culture est indiquée en (annexe1).

Gélose nutritive ordinaire : GNO La composition de ce milieu de culture est indiquée en (annexe 2).

2.1.3 Appareillage

Microscope optique (EUROMEX, CKL, Holland)
Congélateur (Karl kolb, Allemagne)
Lyophilisateur (Crios, France)
Etuve (Mettler, Allemagne)
Autoclave (Webeco-badSchwartau, Allemagne)
Four pasteur (Heraeus, Allemagne)
Bain-marie (Mettler, Allemagne)
Compteur de colonies (Funke GERBER, Allemagne)
pH mètre (imoLab pH 720, Allemagne)
Densimètre (Widder, Allemagne)
Centrifugeuse (Sigma, Allemagne)
Spectrophotomètre (Shimadzu, Allemagne)
Balance de précision (Denver Instrument, Allemagne)

2.1.4 Petit matériel

(boîtes pétri, tube à essais, pipettes, erlenmeyer, verre à pied, anse de platine, pipette pasteur etc...

2.1.5 Produits chimiques et réactifs

- Les cryoprotecteurs utilisés dans la présente étude sont les suivants ;
- DMSO à 5% (DENI et PLOY, 2007)
- Le saccharose à 12% (DENI et PLOY, 2007)
- Le glycérol à 15% (LARPENT, 1997)

➤ Autres produits

Le bleu de méthylène en solution à 5 %, peptone bactériologique, NaCl, réactifs pour coloration de Gram, l'eau oxygénée à 10 volumes, disques d'oxydase, lait écrémé stérile, HCl et NaOH, une galerie API 20 E, gélose TSI (Triple Sugar Iron).

2.2 Méthodes analytiques

La figure 3 résume les étapes suivies lors de la présente étude

2.2.1 Analyses physico-chimiques du lait

2.2.1.1 Mesure du pH

Le pH représente l'acidité du lait à un moment donné. Pour un lait normal, il est compris entre 6,6 et 6,8. Cette légère acidité est due à la caséine par ces groupements phosphoriques, aux substances minérales (phosphates...), et aux acides organiques (citrate).

L'acidité développée par la suite est due à l'acide lactique et autres acides provenant de la dégradation microbienne du lait. Elle fait baisser le pH entre 4 et 5.

On détermine le pH par pH-métrie (VIGNOLA, 2002 ; VIERLING, 2008).

La technique est indiquée en (annexe 3).

2.2.1.2 Mesure de la densité

D'après SINA (1992) Pour une même espèce, la densité n'est pas constante. Elle dépend de la richesse de ce bioproduits en éléments dissous et en suspension, ainsi que de sa teneur en matière grasse. Elle varie aussi en fonction de la température. Ainsi à 20°C, la densité des laits individuels peut prendre des valeurs entre 1,030 et 1,033.

Selon ALAIS (1984), la densité avoisine 1,032 pour les laits de mélange.

La mesure de cette densité est réalisée à l'aide de densimètres.

2.2.1.3 Mesure de l'acidité dornic

Le lait normal présente une acidité de 14 à 17 °D. Les laits acides coagulent au chauffage à partir de 25 °D ou à température ordinaire à 70 °D. Le dosage est effectué par neutralisation de 10 ml de lait avec de la soude N/9 en présence de phénolphthaléine (LARPENT, 1997).

2.2.2 Analyses microbiologiques

2.2.2.1 Test de la réductase

Ce test est appliqué pour estimer la qualité microbiologique générale du lait cru. Son principe est basé sur la décoloration de bleu de méthylène due au métabolisme bactérien. La rapidité de la décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents.

La majorité des microorganismes est en effet, capable en se multipliant, de modifier le potentiel d'oxydoréduction du lait de façon suffisante pour transformer le bleu de méthylène en son leuco-dérivé incolore (LARPENT, 1997 ; GUIRAUD, 1998).

La technique est indiquée en (annexe 4).

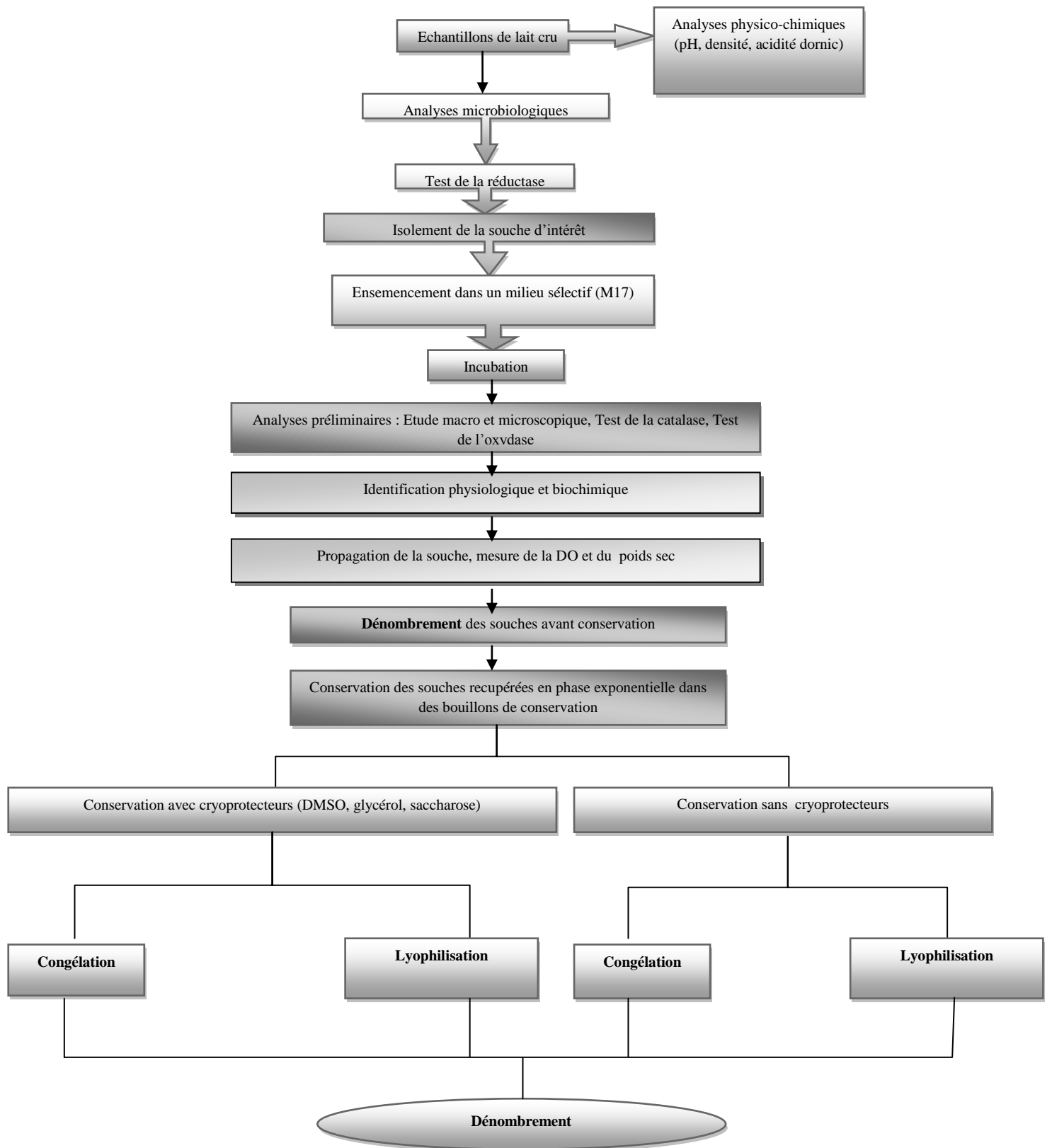


Figure 3 : Procédure expérimentale

La plupart des bactéries lactiques ont un rôle technologique acidifiant, aromatisant, texturant... (LARPENT, 1997). On va procéder dans cette étude à l'ensemencement et au dénombrement des lactobacilles et des streptocoques capables d'évoluer dans le lait cru avant et après cryodessiccation, avec et sans cryoprotecteurs.

2.2.2.2 Isolement de la souche lactique d'intérêt

Des séries de dilutions décimales de lait (10^{-1} à 10^{-6}) ont été effectuées sur du bouillon peptone-sel (1g l^{-1} peptone bactériologique, $8,5\text{g l}^{-1}$ NaCl) et le milieu de culture d'isolement est ensemencé à partir de ces dilutions.

La technique de dilution est indiquée en (annexe 5).

2.2.2.3 Ensemencement dans un milieu sélectif

Les boîtes de Pétri sont ensemencées en surface avec 0,1 ml de la dilution de l'échantillon à analyser. Le milieu de culture utilisé est le milieu M 17. L'incubation est réalisée à 45°C pendant 48 heures.

L'espèce *S. thermophilus* donne des colonies lenticulaires de diamètre égale à 1 à 2 mm, en 48 heures (MALONGA, 1985 ; GUIRAUD, 1998; ZADI KARAM et KARAM, 2006 ; HASAINE et al., 2008).

2.2.2.4 Identification de la souche

La pureté des souches sera contrôlée par des observations, macroscopiques et microscopiques, la coloration de GRAM, le test de la catalase, le test de l'oxydase, le test physiologique et des tests biochimiques sont réalisés avant de procéder à la conservation.

2.2.2.4.1 Analyses préliminaires

2.2.2.4.1.1 Etude morphologique

2.2.2.4.1.1.1 Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu solide, constitue encore, une part importante de l'identification d'un microorganisme.

Sur milieu solide, après une culture en surface (isolement), on peut caractériser les bactéries selon l'aspect des colonies formées. Plusieurs critères sont pris en ligne de compte :

- la taille ;
- la forme ; punctiforme, ronde régulière, dentelée irrégulière (striation radiale ou concentrique) ;
- l'aspect : colonies rugueuse ou R (de l'anglais rough), à surface irrégulière ; colonies lisse, ou S (de l'anglais smooth), à surface lisse, brillante et régulière : colonies muqueuses, ou M, à aspect gras et coulant. Ces différences sont dues à la composition de la paroi et à l'éventuelle présence d'une capsule.

Il faut préciser cependant que cet aspect n'apparaîtra pas sur tous les milieux d'isolement, la composition de ce dernier ayant une grande influence sur le développement des colonies ;

- L'éventuel envahissement du milieu ;
- Le volume : colonies bombées ou plates, étalées ;
- La couleur : selon l'élaboration d'un pigment (ALPHONSE *et al*, 2004).

2.2.2.4.1.1.2 Observation microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne.

2.2.2.4.1.1.2.1 Examen à l'état frais

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40 sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool. Les renseignements obtenus par cette observation consternent principalement la mobilité des bactéries (DENI et PLOY, 2007).

2.2.2.4.1.1.2.2 Examen après Coloration de GRAM

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par PRESCOTT *et al* (2003 (annexe 6).

2.2.2.4.1.2 Test de la catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par PRESCOTT *et al* (2003). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une anse stérile sur une lame de verre contenant une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

Le dégagement de bulles de gaz (d'oxygène) signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

2.2.2.4.1.3 Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c.

La réaction est schématiquement la suivante :

cyt c oxydé + réactif réduit ---> réactif coloré (MARCHAL *et al.*, 1982).

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par KOVACS *et al* (1995). Une colonie pure prise du milieu gélosé est mise sur papier Watman imbibé de réactif

oxydase. Le développement d'une couleur bleue signifie que le test est positif, ce qui signifie que l'isolat possède l'enzyme « oxydase ».

2.2.2.4.2 Identification physiologique et biochimique

La croissance à 10°C après une incubation de 7 jours, 37°C, 40°C, 45°C après une incubation de 48h est testée sur bouillon M17. La tolérance à différentes concentration d'NaCl est déterminée en utilisant le bouillon M17 contenant 2%, 3%, 4%, 6,5% NaCl, après incubation à 37 °C pendant 48h.

La croissance à pH 9,2, 9,6) est aussi déterminée sur bouillon M17 en utilisant HCl et NaOH pour ajuster ce pH.

La thermorésistance par chauffage du milieu à une température de 63°C pendant 30min est testée sur bouillon M17, l'incubation est réalisée durant une période de 24 à 48h à 37 °C.

La croissance sur lait bleu de Sherman est également étudiée. Du lait à 1% de méthylène estensemencé et incubé durant une période de 24 à 48h à 37 °C (Annexe7) (GUIRAUD, 1998, KACEM *et al.*, 2003 ; ABDEL MONEIM *et al.*, 2006 ; KHEDID *et al.*, 2009 ; HASSAINE *et al.*, 2008).

➤ Type de fermentation

Le type de fermentation est déterminé par le test de SPEBER et SWAN, cloche de Durham et sur gélose TSI

Test de SPEBER et SWAN:

Le bouillon M17 estensemencé à partir d'une culture de 24h sur M17 gélose, après incubation à 30°C pendant 24h, il faut plonger une anse chauffée au rouge dans la culture, et vérifier s'il y'a ou non dégagement de CO₂ (LARPENT, 1997).

La production de gaz à partir de la fermentation de glucose est étudiée dans le bouillon M17 contenant la cloche de Durham (SMELIS *et al.*, 1994 ; HASSAIN *et al.*, 2008).

➤ Gélose TSI

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène. Aprèsensemencement de culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées, l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24h (SULKIN et WILLET, 1940 ; HAJNA, 1945 ; ANONYME 1, 2000 ; ANONYME 2, 2001).

➤ Hydrolyse de l'amidon

L'hydrolyse de l'amidon est caractérisée au lugol après trois jours d'incubation de l'espèce dans la gélose ordinaire additionnée de 0,3 % d'amidon soluble (BEKHOUCHE et BOULAHROUF., 2005) (Annexe7).

2.2.2.4.3 Propagation de la souche

Avant d'être conservées, les bactéries doivent être obtenues en culture pure. Elles doivent, durant la durée de stockage, être dans des conditions de non multiplication en milieu solide et en présence d'agents protecteurs et doivent être prélevées sur une culture récente (DENI et PLOY, 2007).

2.2.2.4.3.1 Préparation de préculture

A partir d'une culture pure et jeune sur gélose M17, on prélève quelques colonies qui seront transférées dans un tube de 10ml de milieu M17 liquide, puis on l'incube à 42°C pendant 24h. Après 24h d'incubation, on introduit aseptiquement 1ml de cette préculture dans un erlenmeyer d'une capacité de 100ml qui contient 30ml du milieu, puis on l'incube 42°C pendant 17h sans agitation. Lorsque la croissance bactérienne est suffisamment avancée, ce milieu servira à inoculer le milieu de culture.

La culture est réalisée dans des erlenmeyer d'une capacité de 500ml, contenant 300ml de milieu de culture M17, ces erlenmeyers sontensemencés stérilement par 30ml de préculture et incubés à 42°C sans agitation (BOUDJEMAA, 2008)

2.2.2.4.4 Mesure de la turbidité

La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique qui est effectuée à une longueur d'onde de 600nm au spectrophotomètre.

Dans le cas des dilutions, la turbidité est proportionnelle à la biomasse lorsqu'elle ne dépasse pas la limite 0,5- 0,6 en unité d'absorbance (ONER et ERIKSON., 1986).

Lorsqu'une suspension cellulaire dans un milieu limpide est traversée par un faisceau lumineux monochromatique, elle absorbe une quantité de lumière qui est proportionnelle à sa concentration cellulaire selon la loi de Beer Lambert (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991) (Annexe 8).

2.2.2.4.5 Mesure du poids sec

Pour mesurer le poids sec de la biomasse, on procède de la manière suivante :

- 20ml de la culture liquide est centrifugée à 3000 tours/minute pendant 20 à 45 minutes, temps nécessaire pour faciliter la séparation de la biomasse ;
- le surnageant est séparé du culot ;
- le culot ainsi obtenu est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile en prenant soin de centrifuger après chaque lavage ;
- un maximum de surnageant est éliminé, puis le culot est mis en suspension dans un minimum d'eau distillée stérile;

- le culot en suspension est pesé puis séché, dans une étuve à 105°C pendant 16 h ;
- Après refroidissement au dessiccateur, repeser le culot en suspension jusqu'au poids constant ;

Le poids est déterminé par la formule suivante :

$$P (g/l) = (m - m_0) / 0,02$$

Ou m_0 : masse de culot en suspension avant séchage (g)

m : masse de culot en suspension après séchage (g) (AMRANE, 1991).

La mesure de la densité optique et celle du poids sec, nous permet de tracer une courbe de croissance spécifique à la souche.

Pour évaluer la conservation, on détermine le taux de survie des souches après stockage d'une durée deux mois. Pour se faire, on procède a des dénombrements avant et après traitement, en la présence et en l'absence des trois cryoprotecteurs (glycérol, saccharose, diméthyle sulfoxide).

2.2.2.4.6 Numération avant conservation

Selon DENI et PLOY (2007), la concentration bactérienne doit être supérieure à 10^4 bactéries/ millilitre de suspension. C'est pour cela que l'on a effectué des dilutions successives au $1/10^6$ en tube de 9 ml de diluant (peptone-sel) ont été réalisées à partir de culot de centrifugation séché. Ces dilutions servent à l'ensemencement des milieux de cultures spécifiques contenus dans des boites de pétri.

Après incubation dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, le dénombrement est réalisé pour chaque dilution en milieu solide à l'aide d'un compteur de colonies. On ne tient compte que les boites qui contiennent entre 30 et 300 colonies, et pour déterminer le nombre d'UFC, on utilise la formule suivante :

$$\text{UFC/ml} = \text{nombre de colonies} \times 1/V_e \times 1/D$$

V_e étant le volume d'ensemencement et D étant la dilution prise en compte (GUIRAUD, 1998 ; OUADGHIRI, 2009; KHEDID et *al.*, 2009).

2.2.3 Conservation des souches isolées

2.2.3.1 Préparation de milieu de conservation

Le milieu nutritif de conservation est préparé dans 4 flacons de 250 ml dont la composition du milieu témoin est la suivante:

Peptone 10g ; NaCl. 5g ; extrait de viande, 3g ; extrait de levure, 5g ; glucose, 1g ; Na_2HPO_4 , 4g ; eau distillée 1l.

Les 3 autres flacons sont additionnés de 150 ml d'agent protecteur (glycérol, saccharose, dimethyl sulfoxyde).

Ces milieux sont préparés à part et stérilisés par autoclave à 121°C pendant 15min (Annexe 9) (LARPENT, 1997).

2.2.3.2 Préparation et inoculation des tubes de conservation

A l'aide d'une anse de platine, on pèse aseptiquement le culot de centrifugation séché après atteinte de la phase exponentielle de croissance et on le met en solution dans les milieux de conservation préalablement préparés. Ces solutions mères sont réparties dans des tubes en plastique, stériles munis d'un bouchon hermétique, de 4ml de capacité, puis elles sont conservées pendant deux mois par congélation et lyophilisation.

2.2.3.3 Congélation

Les solutions mères sont réparties en 4 tubes de conservation. Le premier considéré comme témoin, contient le milieu de conservation, le deuxième est additionné de diméthyl sulfoxyde (à raison de 5%), le troisième de saccharose (à raison de 12%) (DENI et PLOY, 2007), le quatrième de glycérol (à raison 15%) (LARPENT, 1997). Tous les tubes sont ensuite congelés à -30°C.

2.2.3.4 Lyophilisation

Les solutions mères sont coulées en une fine lamelle dans des boîtes pétri en verre et placées rapidement dans un congélateur (-30 °C). On procède ensuite à la lyophilisation des échantillons. Les lyophilisats sont ensuite conservés à 4°C à l'abri de la lumière (Denis et Ploy, 2007) pendant deux mois.

2.2.3.5 Numération après conservation

Les suspensions microbiennes congelées sont lentement décongelées à la température ambiante 37°C. Après homogénéisation manuelle des tubes, on réalise des dilutions décimales à partir de chaque tube. On ensemence ensuite des milieux de cultures spécifiques. Après incubation, le dénombrement est réalisé pour chaque dilution en milieu solide, à l'aide d'un compteur de colonies.

La numération des suspensions microbiennes lyophilisées est effectuée après réhydratation de lyophilisat par le diluant. On procède à une homogénéisation des suspensions, manuellement. On réalise des dilutions décimales à partir de chaque tube. On ensemence ensuite des milieux de cultures spécifiques. Après incubation, le dénombrement est réalisé pour chaque dilution en milieu solide à l'aide d'un compteur de colonies.

L'effet de cryoprotecteurs sur la conservation de la souche étudiée, par congélation et par lyophilisation est mis en évidence par la méthode de dénombrement des colonies, durant et après une durée de stockage de deux mois en l'absence et en présence de ces substances cryoprotectrices.

Les différents échantillons constitués sont rassemblés dans le **tableau I**.

Tableau I : Constitution des échantillons expérimentaux

Numéro de l'échantillon	Nature et pourcentage de cryoprotecteurs	Nature du traitement de conservation
1	Sans cryoprotecteur (témoin)	congélation
2	DMSO à 5%	
3	Saccharose à 12%	
4	Glycérol à 15%	
5	Sans cryoprotecteur (témoin)	lyophilisation
6	DMSO à 5%	
7	Saccharose à 12%	
8	Glycérol à 15%	

III. Résultats et discussions

III. Résultats et discussion

3.1 Qualité physico-chimique du lait

Les résultats relatifs aux caractéristiques physico-chimiques sont regroupés dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin

Paramètres physico-chimiques	Moyenne	Ecart type
pH	6,53	0,057
Acidité Dornic (°D)	18,16	0,381
Densité	1,0223	0,00057

3.1.1. pH

Les échantillons de lait camelin analysés présentent une valeur moyenne de pH égale à $6,53 \pm 0,057$. Le lait camelin est donc légèrement plus acide que le lait bovin qui présente un pH compris entre 6,6 et 6,8 (VIGNOLA, 2002 ; VIERLING, 2008). Dans ce contexte, SALEY (1993) rapporte que le lait camelin de par sa richesse particulière en acide ascorbique (vitamine C), présente un pH plus faible que celui d'autres espèces.

Les valeurs de pH relevées dans la présente étude se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tels que SBOUI *et al.*, (2009) en Tunisie (pH = $6,41 \pm 0,18$), KONUSPAYEVA *et al.*, (2003) en Asie centrale (pH = 6,54 - 6,63), KAMOUN (1995) en Tunisie (pH = $6,51 \pm 0,12$), SIBOUKEUR (2007) en Algérie ($6,31 \pm 0,15$).

3.1.2. Acidité titrable

L'acidité titrable moyenne des échantillons de lait camelin analysés est égale à $18,16 \text{ } ^\circ\text{D} \pm 0,381$. Elle est comparable aux valeurs rapportées par la littérature sur le lait camelin. Ainsi, certains auteurs avancent des valeurs légèrement plus élevées, tels que SIBOUKEUR (2007) ($18,2 \text{ } ^\circ\text{D} \pm 2,93$), TOURETTE *et al.*, (2001) cite un intervalle de [19,0-19,7] avec une moyenne de $19,3 \text{ } ^\circ\text{D}$. D'autres auteurs trouvent des valeurs moins élevées tels que SBOUI *et al.*, (2009) ($17,2 \pm 1,03$) et KAMOUN (1995) ($15,6 \pm 1,4$).

Le pH et l'acidité Dornic du lait des autres espèces sont inversement proportionnels (SINA, 1992). Cette proportionnalité est peu accentuée dans le cas du lait de chamelle dont l'effet tampon relativement plus élevé s'oppose au changement brusque du pH lors d'une augmentation de l'acidité Dornic. Ceci permet d'expliquer l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité Dornic du lait camelin (ABUTARBOUSCH, 1996 ; TOURETTE *et al.*, 2001).

3.1.3 Densité

La valeur moyenne de la densité des échantillons de lait camelin est égale à $1,0223 \pm 0,00057$. Le lait camelin serait moins dense que le lait de vache dont la densité fluctue entre 1,030 et 1,033 (SINA, 1992).

Les valeurs de densité obtenues se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tels que SBOUI *et al.*, (2009) (Densité= $1,02 \pm 0,0032$), SIBOUKEUR (2007) (Densité= $1,0230 \pm 0,0045$). D'autres auteurs avancent des valeurs plus élevées tels que KAMOUN (1995) (Densité= $1,028 \pm 0,002$), FARAH (1993) (1.0250-1.0320 avec une moyenne de 1.0290).

La variabilité des valeurs entre les différents échantillons de laits analysés et entre celles citées dans la littérature, s'explique par la faible teneur en matière sèche totale du lait camelin KAMOUN (1995), elle-même liée à l'abreuvement SIBOUKEUR (2007).

Le lait de chamelle se caractérise en fait, par une teneur en matière sèche plus faible (moyenne de 116 ± 11) par rapport au lait de vache (124 ± 3) KAMOUN (1995).

3.2. Analyse microbiologique

3.2.1. Test de la réductase

Le temps de décoloration de bleu de méthylène est de 6 heures. Cette réduction lente du bleu de méthylène, s'explique par une faible charge microbienne. Selon LARPENT (1997), la qualité hygiénique des laits collectés peut être considérée comme bonne (Annexe 4).

3.2.2. Identification de la souche d'intérêt isolée et purifiée

3.2.2.1. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche isolée

Les résultats de l'identification de la souche d'intérêt, isolée sur milieu M17 puis purifiées par cinq repiquages successifs, sont regroupés dans le tableau III.

Tableau III : Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de la souche

Tests d'identification	Résultats
Observation macroscopique	Colonies blanches lenticulaires de 1mm de diamètre
Observation microscopique	Cocci regroupés en diplocoques et en chainettes
Examen à l'état frais	Cocci immobiles
Coloration de GRAM	+
Catalase	-
Oxydase	-
croissance à 10°C	-
croissance à 37°C	+
croissance à 40°C	+
croissance à 45°C	+
croissance à 2% d'NaCl	+
croissance à 3% d'NaCl	+
croissance à 4% d'NaCl	+
croissance à 6, 5% d'NaCl	+
croissance à pH 9,2	+
croissance à pH 9,6	-
Thermorésistance de 63°C pendant 30min.	+
Lait au bleu de Sherman	-
Type de fermentation	Homofermentaire
Hydrolyse de l'amidon	+
Lactose	+
Glucose	+
Saccharose	+

On observe un trouble sur bouillon M17 après une incubation à 37°C, 40°C, 45°C ; le bouillon M17 incubé à 10°C ne présente pas de trouble. La souche a pu croître à 37°C, 40°C, 45°C, mais pas 10°C. Un trouble est observé sur le même bouillon contenant 2%, 3%, 4%, 6,5% de chlorure de sodium.

Les résultats relevés dans la présente étude concernant la tolérance de la souche à une concentration d'NaCl égale à 2% et 4% sont comparables à ceux rapportés par certains auteurs (TORRIANIE *et al.*, 1997). Toutefois, selon MALONGA (1985) et LARPENT (1997) les streptocoques ne cultivent pas dans un milieu contenant 2% et 4% d'NaCl.

La souche lactique isolée dans la présente étude pousse également à une concentration de 6,5% d'NaCl. Ce caractère la distingue des espèces habituellement décrites dans la littérature qui présentent normalement une intolérance à des concentrations de 6,5% d'NaCl (GUIRAUD, 1998). La capacité inattendue de résister à une concentration de 6,5% de NaCl aurait probablement pour origine une sélection due à l'environnement naturel de ces bactéries, c'est-à-dire le lait de chamelle. En effet, on sait que ce lait est caractérisé par une salinité plus ou moins prononcée due aux plantes broutées, souvent halophytes (FARAH, 1993). Les caractéristiques organoleptiques et surtout le goût du lait de chamelle diffère selon l'alimentation des animaux et la disponibilité en eau SBOUI *et al.*, (2009). L'ingestion de fourrages comme la luzerne, donne un goût sucré, certaines plantes halophytes le rendent salé SBOUI *et al.*, (2009).

Les souches de lactocoques résistantes au sel peuvent présenter un intérêt technologique car elles pourraient en effet être testées pour transformer le lait camelin lui-même, ou encore dans des fermentations de produits salés (fromages salés, olives, concombres, viandes, ...) (KARAM- ZADI *et KARAM.*, 2006).

La bactérie est capable de croître à pH= 9,2 et à pH=9,6. Elle résiste à 63°C pendant 30min, alors que la croissance sur lait bleu de Sherman est négative.

Elle est homofermentaire, l'absence de dégagement de CO₂ est confirmée par le test de SPEBER et SWAN.

Sur gélose TSI, on a observé que la souche fermente le lactose, saccharose et glucose (sans production de gaz) par transformation de la couleur de la gélose au jaune.

L'apparition d'une couleur jaunâtre autour de la culture bactérienne après révélation par le lugol indique que la souche dégrade de l'amidon (OUDRAOGO, 2007).

3.2.2.2 Observations, macroscopique et microscopique

Les colonies apparaissent blanches, de petites tailles (1 mm de diamètre), lenticulaires (photo1).

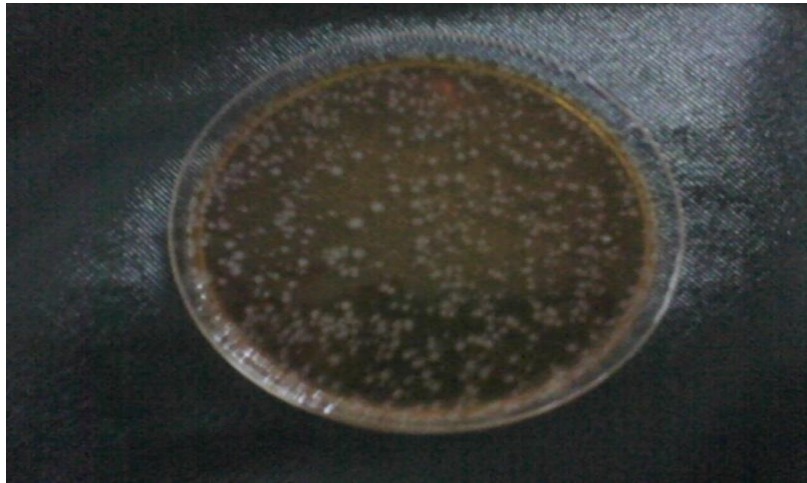


Photo 1 : Aspect microscopique des colonies

Après coloration de GRAM, on observe des cocci, rassemblés en diplocoques et en chainettes, GRAM positif (photo 2).

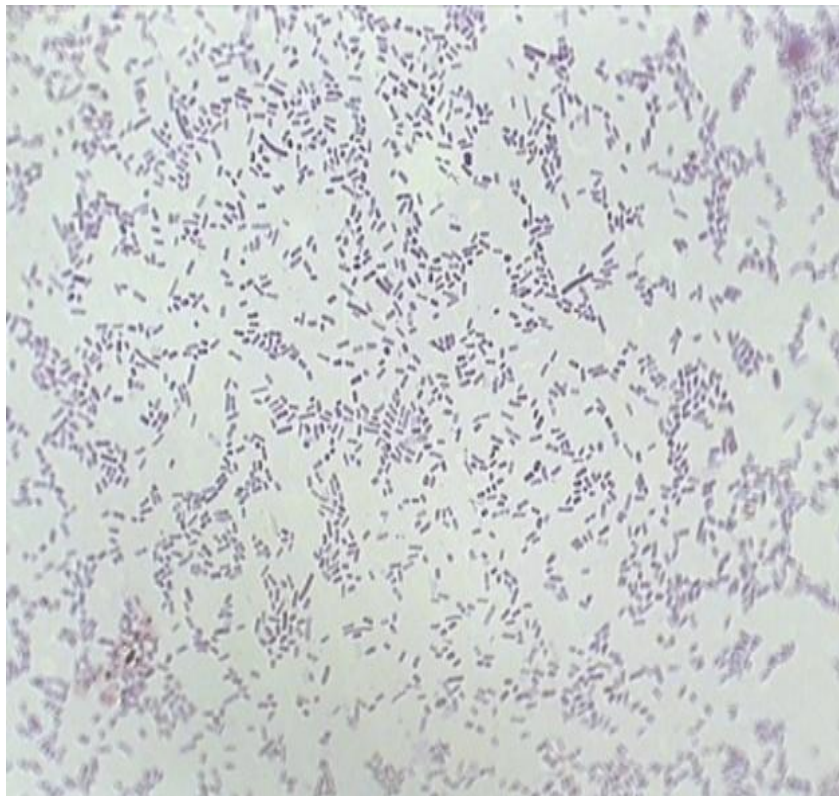


Photo 2 : Observation des cellules après coloration de GRAM ($\times 100$)

Ces bactéries sont catalase négative et oxydase négative. Les résultats relatifs aux examens physiologiques et biochimiques, macroscopiques et microscopiques, permettent de confirmer l'appartenance de la souche au groupe de streptocoques (SCHMIDT et LENOIR, 1972). L'aptitude de la souche à croître à 37°C, 40°C, 45°C, mais pas 10°C la différence de l'espèce *Lactococcus lactis* et confirme son appartenance à l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

3.2.3. Mesure de la densité optique

La courbe de croissance de la souche identifiée est mesurée à travers la mesure de la DO de la culture bactérienne dans le temps (figure 4).

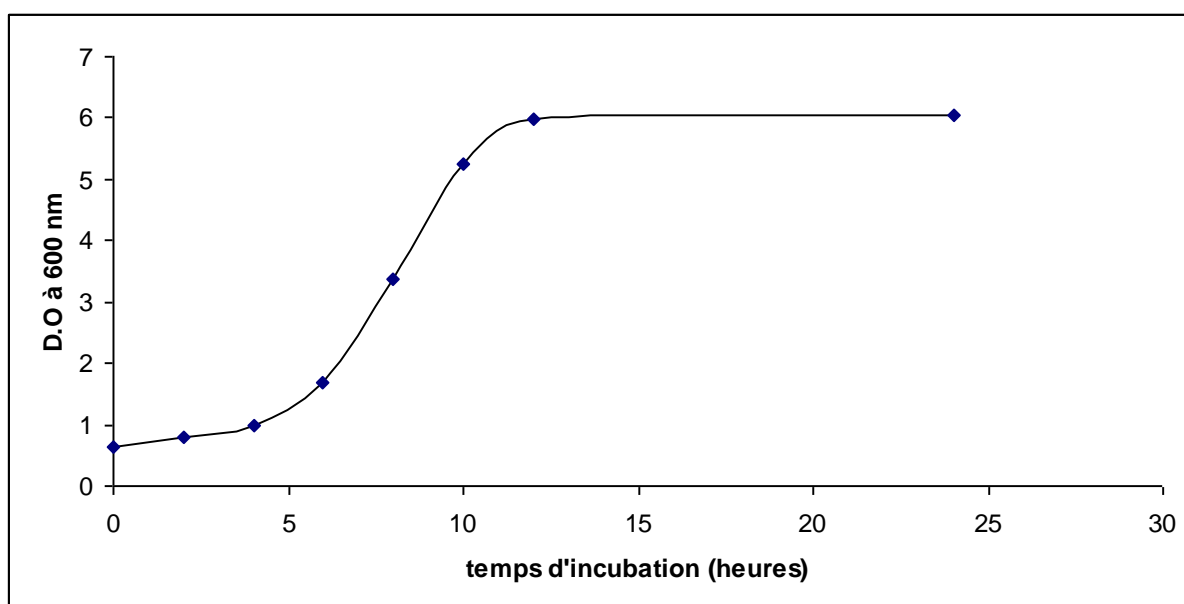


Figure 4 : Mesure de la densité optique en fonction de la durée d'incubation de la souche de *Streptococcus thermophilus*

Après récupération de la biomasse, nous avons préparé une gamme étalon avec différentes concentrations en biomasse, puis nous avons tracé une courbe d'étalonnage représentée dans la figure 5.

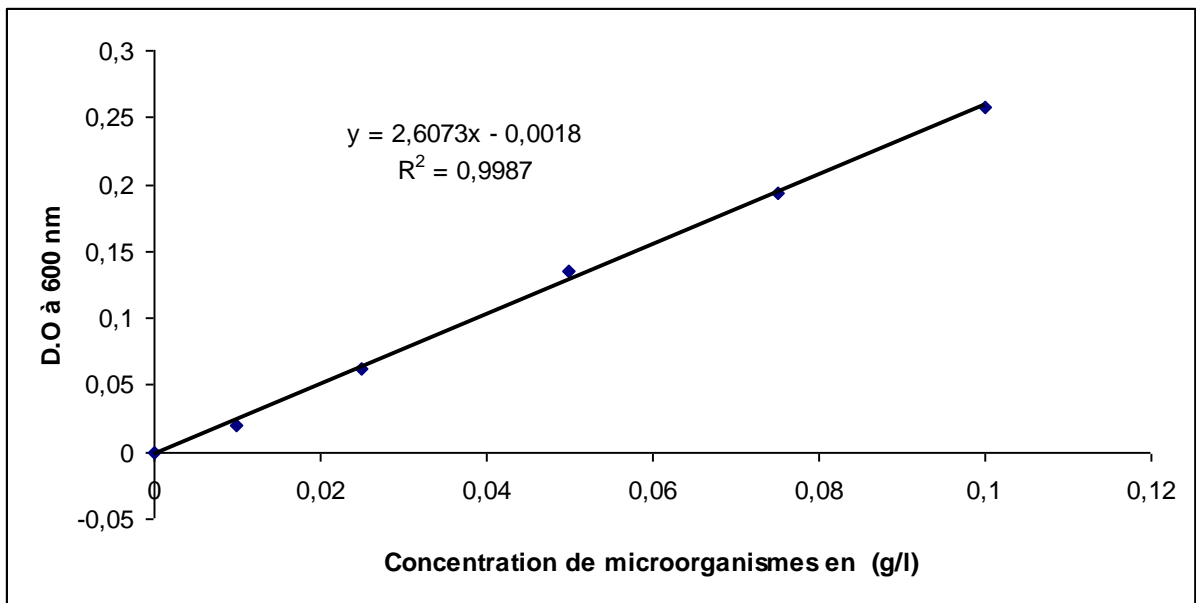


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la concentration en biomasse

A partir de l'équation $Y = 2,6073x - 0,0018$ on a calculé le X qui représente la concentration cellulaire et on a tracé la courbe de croissance illustrée par la figure 6.

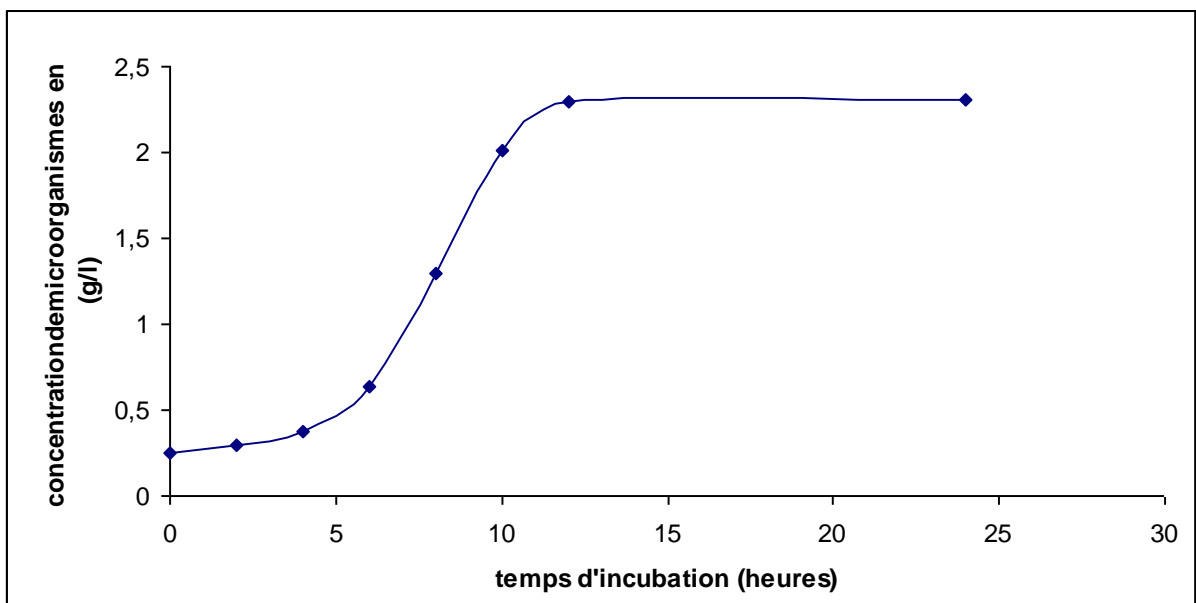


Figure 6: Courbe de croissance de la souche *Streptococcus thermophilus*

On remarque que la souche atteint sa phase exponentielle après environ 6 heures d'incubation (figure 6). Ce résultat est comparable à celui relevé par BOUDJEMAA (2008) pour une souche bovine de *Streptococcus thermophilus* S13 dans le but de la production d'acide

lactique sur du lactosérum bovin. La souche utilisée dans la présente étude (*Streptococcus thermophilus*) étant isolée à partir du lait camelin est incubée dans le bouillon M17, on peut dire que les deux souches, bovine et cameline présentent une même cinétique de croissance dans les mêmes conditions de pH et de température, respectivement égaux à pH 6,42 et 42°C, mais sur des milieux différents.

3.3. Conservation des souches isolées

3.3.1 Numération avant conservation

Le nombre de colonies obtenu avec dilutions 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} étant indénombrable (plus de 300 colonies), les boîtes de pétri correspondantes ne seront pas prises en considération. Nous tiendrons compte des boîtes correspondant aux dilutions 10^{-5} , 10^{-6} qui ont donné des nombres de $2,9 \cdot 10^8$, $8 \cdot 10^8$ UFC /ml. Ces valeurs sont satisfaisantes car elles sont supérieures à 10^4 bactéries/ ml de suspension (DENI et PLOY, 2007) et que le niveau d'inoculation habituel du lait par les lactocoques en technologie fromagère se situe entre 10^7 et 10^8 UFC /ml (De ROISSART et LUQUET, 2004).

3.3.2 Numération sans et avec cryoprotecteurs

Le taux de survie de la souche après application des techniques de concentration, en l'absence (témoins) en la présence de cryoprotecteurs (DMSO, glycérol, saccharose) en fonction de la durée de stockage est déterminé par le rapport suivant.

Taux de survie (%) = $\frac{\text{In cellules viables après concentration}}{\text{In cellules viables avant concentration}} \times 100$.

In cellules viables avant concentration

Chaque résultat est la moyenne de 3 répétitions. Le tableau VI en résume l'essentiel.

Tableau VI : Taux de survie de la souche après concentration, en l'absence (témoins) et en la présence de cryoprotecteurs

milieux et conditions de conservation		Avant concentration		1 mois après concentration		1 mois et ½ après concentration		2 mois après concentration	
		UFC/ml	%	UFC/ml	%	UFC/ml	%	UFC/ml	%
Lyophilisation	Témoin	8×10^8	100	$2,3 \times 10^8$	93,91	$2,6 \times 10^8$	94,51	$2,0 \times 10^8$	93,23
	Témoin+DMSO	8×10^8	100	$5,6 \times 10^8$	98,26	$5,2 \times 10^8$	97,89	$5,5 \times 10^8$	98,17
	Témoin+Glycérol	8×10^8	100	$5,3 \times 10^8$	97,99	$5,5 \times 10^8$	98,17	$5,2 \times 10^8$	97,89
	Témoin+Saccharose	8×10^8	100	$6,7 \times 10^8$	99,13	$6,7 \times 10^8$	99,13	$6,8 \times 10^8$	99,20
Congélation	Témoin	8×10^8	100	$5,9 \times 10^6$	76,05	$3,9 \times 10^6$	74,03	$2,2 \times 10^6$	71,23
	Témoin+ DMSO	8×10^8	100	$5,3 \times 10^8$	97,99	$5,5 \times 10^8$	98,17	$5,2 \times 10^8$	97,89
	Témoin+ Glycérol	8×10^8	100	$5,1 \times 10^8$	97,80	5×10^8	97,70	$5,2 \times 10^8$	97,89
	Témoin+Saccharose	8×10^8	100	$5,2 \times 10^8$	97,89	$4,9 \times 10^8$	97,60	$5,3 \times 10^8$	97,99

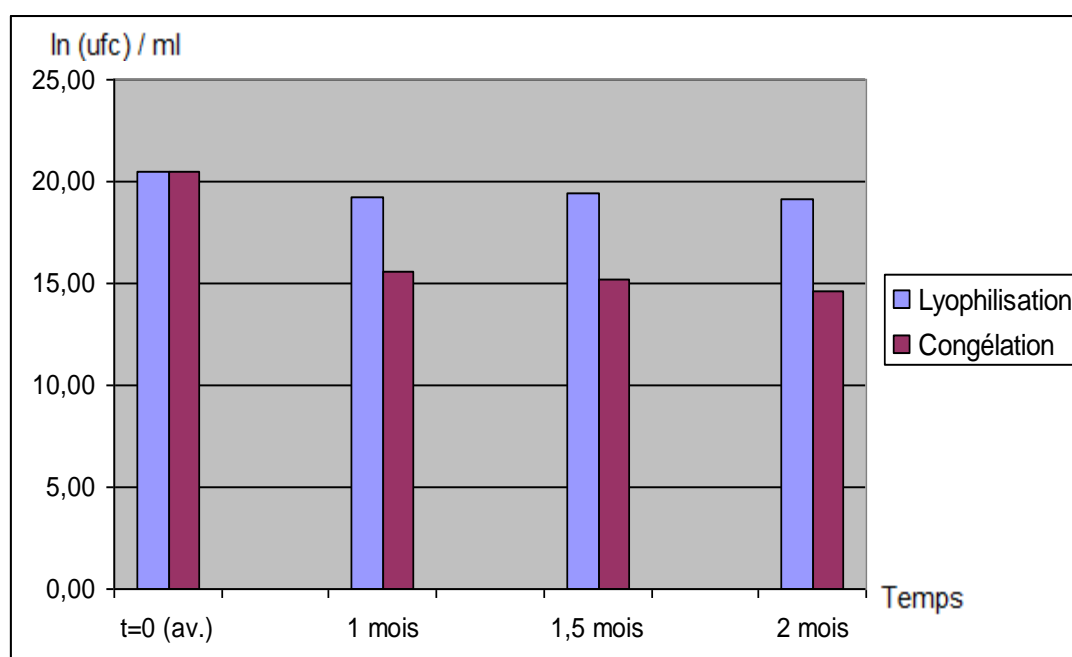


Figure 7 : Effet de la nature du traitement de concentration en l'absence de cryoprotecteurs, sur la survie de la souche en fonction du temps de stockage

A partir de la figure 7, on observe que les échantillons lyophilisés sans cryoprotecteurs (témoins) résistent mieux au traitement puisqu'ils présentent un meilleur taux de survie pendant les deux mois de stockage, comparativement aux échantillons congelés (93.23 %

versus 71.23 %). Leur taux passe en effet, de 8×10^8 ufc/ml à $2,0 \times 10^8$ et $2,2 \times 10^6$ ufc/ml respectivement, après deux mois d'entreposage (tableau VI).

L'étape de congélation est spécialement critique par ses effets négatifs sur la viabilité, l'état physiologique de la bactérie et la restauration de l'activité après décongélation (TSVETKOV et SHISHKOVA, 1982 ; BRASHEARS et GILLILAND, 1995; FOSCHINO et *al.*, 1996; NOVIK et *al.*, 2009). Si la congélation est suffisamment lente, l'eau aura le temps de sortir à partir de la cellule par osmose en provoquant la formation des cristaux dans le milieu extérieur (CHAMPAGNE et *al.*, 1991; SANDERS et *al.*, 1999). En plus la cristallisation de l'eau provoque la cryoconcentration du soluté qui produit un déséquilibre osmotique (MERYMAN, 1968). Cette déshydratation causée par la congélation est l'une des conséquences nocives identifiées dans la cryobiologie cellulaire. Elle cause plusieurs des dommages y compris des changements dans l'ultra structure de la membrane cellulaire, la destruction de la bicouche membranaire et des organelles (FULLER, 2004).

Le deuxième événement majeur des dommages, identifié lors de la congélation des cellules c'est la propagation intracellulaire des cristaux de glaces. La formation des cristaux de glaces intracellulaire disloque la cellule. Ce phénomène a lieu généralement durant la congélation rapide où il n'y a pas suffisamment le temps pour que l'eau se déplace de la solution intracellulaire diluée, vers le milieu extracellulaire concentré. Le mécanisme exacte du dommage causé par les cristaux intracellulaires reste mal connu, mais peut provoquer la destruction physiques des membranes, la formation des bulles de gaz et la destruction d'organelles (FULLER, 2004). Les inconvénients cités ci-dessus peuvent expliquer la diminution du nombre de cellules bactériennes observées dans les échantillons congelés et lyophilisés à un moindre degré.

La température de congélation représente également un facteur critique pour la lyophilisation (CHAMPAGNE et *al.*, 1991; SANDERS et *al.*, 1999). Toutefois la diminution du taux de survie pour les échantillons lyophilisés est peu prononcée par rapport à celle des échantillons congelés (tableau VI et figure 7). On peut dire que la souche ayant fait l'objet de la présente étude a mieux supporté la méthode de concentration par lyophilisation que celle par congélation, en l'absence de cryoprotecteurs.

A partir de la figure 8, il semblerait que les trois cryoprotecteurs utilisés (le DMSO, le glycérol et le saccharose) améliorent le taux de survie de la souche bactérienne conservée par congélation comparativement à l'échantillon témoins (71.23 %), puisque les courbes se superposent et les taux de survie sont proches : 97.89 avec le DMSO et glycérol, 97.99 avec le saccharose.

La figure 9 montre une nette amélioration du taux de survie des échantillons lyophilisés sans et avec cryoprotecteur. Le saccharose semble plus efficace que les deux autres avec un taux de survie égale à 99.20%. Il est suivi par le DMSO (98.17 %) puis le glycérol (97.89 %). Les résultats enregistrés lors de la présente étude sont confortés par des données bibliographiques selon lesquelles les suspensions bactériennes possèderaient une bonne habilitation de survie durant le stockage, même sans cryoprotecteurs. Ce comportement peut être expliqué par :

*La cryotolérance de la souche *Streptococcus thermophilus* due à certaines propriétés morphologiques et fonctionnelles de ce microorganisme (NOVIK et al., 2009) ;

-l'utilisation dans la présente étude d'un milieu de conservation frais avec ou sans cryoprotecteurs. En effet, les streptocoques thermophiles font parties des bactéries lactiques. Ces dernières sont des microorganismes qui exigent des milieux complexes pour leur culture. Elles sont habituellement cultivées dans des milieux riches contenant du glucose, des peptones, de l'extrait de viande et de l'extrait de levures. Les données de la littérature suggère que la plupart de ces composés possède des bonnes propriétés cryoprotectrices, permettant d'expliquer l'effet protecteur du milieu « de conservation », pendant le stockage sans addition des cryoprotecteurs (NOVIK et al., 2009).

Dans ce contexte, l'extrait de levures serait bénéfique pour la préservation de l'activité des souches *St. lactis* et *St. cremoris* stockées à -20° C (BAUMANN et REINBOLD, 1964). Selon CLEGG (1986), CROWE et CROWE (1986), l'extrait de levures contiendrait plusieurs acides aminés principalement le glutamate. Ces acides aminés seraient responsables de différentes habilitations spécifiques à la survie de certaines espèces bactériennes.

*La survie des bactéries suite au cycle congélation / décongélation, dépend à la concentration initiales des cellules. Une augmentation de la survie est observée avec une concentration initiale importante des cellules. Le taux de survie des bactéries lactiques (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) ayant été conservées par lyophilisation augmente avec l'augmentation de la biomasse. Cette constatation est attribuée à la protection réciproque des microorganismes contre les conditions environnementales sévères, par réduction de la région interfaciale entre les cellules et le milieu extérieur (FONSEKA et al., 2006)

➤ **La relation de la résistance a la congélation et la composition en acide gras**

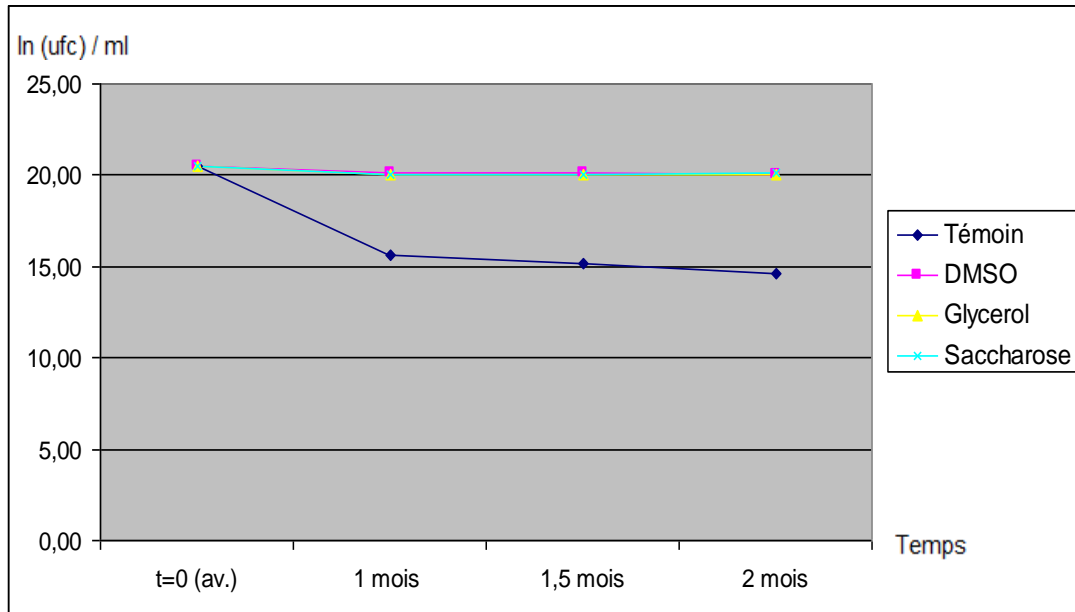


Figure 8: Comparaison de l'effet des trois cryoprotecteurs sur la souche congelée en fonction du temps de stockage

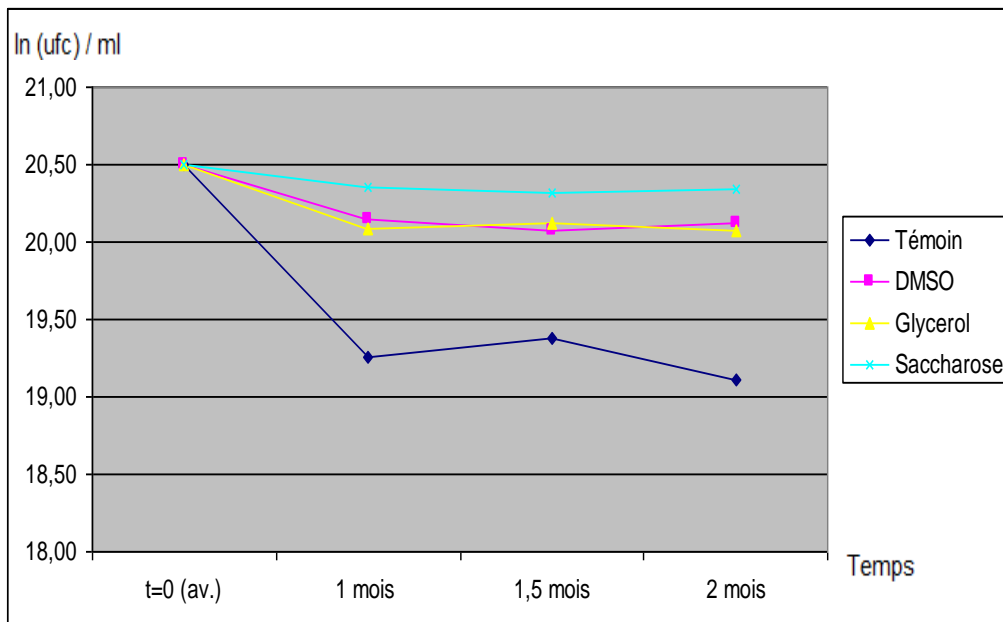


Figure 9: Comparaison de l'effet des trois cryoprotecteurs sur la souche lyophilisée en fonction du temps de stockage

Comme la membrane cellulaire est la première cible de la modification de l'environnement de la cellule. Son aptitude à s'y adapter détermine sa survie de la cellule (SAJBIDOR, 1997). La diminution de la température affecte la structure et les propriétés de la membrane cellulaire. Durant la congélation, la phase liquide se transforme en phase cristalline, d'où la diminution de la fluidité membranaire (SIMATOS et al., 1994). Le rôle important de l'organisation des acides gras dans la perméabilité de la membrane, la viscosité de la membrane (SAJBIDOR, 1997) et l'épaisseur de la membrane (IN'T VELD et al., 1992) sont attribuées aux acides gras insaturés de la membrane (BRENNAN et al., 1986; TEIXEIRA et al., 1996). Les acides gras insaturés et les acides gras cyclopropanes (CFA) stimulent l'échange entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, rendent la membrane plus rigide et augmentent la perméabilité membranaire : L'acide dihydrosterculique (C₁₉: Δ9) est responsable de l'élasticité et de la flexibilité de la membrane (SMITTLE et al., 1974), et l'acide lactobacillique (C₁₉: Δ11) permet la mobilité latérale de la membrane cellulaire (NIKKILA et al., 1996). Les neuf acides gras qui composent la membrane des *Streptococcus thermophilus* sont l'acide tétradécanoïque (ou acide myristique) (C₁₄:0), l'acide hexadécanoïque (ou acide palmitique) (C₁₆:0), l'acide hexadécanoleïque (ou acide palmitoleïque) (C₁₆: Δ9), l'acide octadécanoïque (ou acide stéarique) (C₁₈:0), l'acide cis-9-octadécanoléïque (ou acide oléique) (C₁₈: Δ9), l'acide cis-11-octadécanoïque (ou acide vaccénique) (C₁₈: Δ11), l'acide méthylèneoctadécanoïque (ou acide dihydrosterculique) (C₁₉: Δ9), l'acide éicosanoïque (ou acide arachidique) (C₂₀:0), et l'acide éicosanoléïque (C₂₀:1). A l'exception de C₂₀:1, la plus part de ces acides gras sont identifiés chez d'autres bactéries lactiques mais ce n'est pas le cas chez *Streptococcus thermophilus*, la présence de C₂₀:1 peut caractériser cette souche (BEAL et al., 2001).

La relation entre la composition en acide gras et la survie de quelques bactéries lactiques a été précédemment établie. Les auteurs considèrent la concentration en quelques acides gras insaturés ou bien le taux entre les acides gras insaturés et saturés (I/S) responsable du taux de survie. Ainsi, le taux de survie des cellules congelées de *Lactobacillus bulgaricus* augmenterait avec la concentration en acide dihydrosterculique (C₁₉: Δ9) (SMITTLE et al., 1974). Le taux de (I/S) accroît la résistance à la congélation de *lactococcus lactis subsp. lactis* et celle de *Lactobacillus* sp. Le taux de survie des cultures lyophilisées de *Lb. Bulgaricus* diminue avec la concentration relative des acides gras insaturés (CASTRO et al., 1995). Finalement le taux de survie de *Lb. Bulgaricus* séchés est relié au rapport (I/S) (TEIXEIRA et al., 1996).

La distribution des acides gras dépend aussi de l'âge de la culture, le changement d'acide vaccénique ($C_{18} : \Delta 11$) en acide lactobacillique ($C_{19} : \Delta 11$) (LONVAUD-FUNEL et DESENS, 1990) ou bien de l'acide oléique ($C_{18} : \Delta 9$), en acide dihydrosterculique ($C_{19} : \Delta 9$) (SUUTARI et LAAKSO, 1992) sont observés avec l'augmentation de l'âge de la culture. Finalement la composition en acides gras évolue durant le stockage. TEIXEIRA et *al.* (1996) observent que le taux (I/S) est stable pendant 49 jours puis diminue. Cette diminution de ce est reliée à l'oxydation des acides gras insaturés qui sont très sensibles à l'oxygène est et accentuée par l'augmentation de l'humidité relative résiduelle, qui active le processus de l'oxydation (CASTRO et *al.*, 1995).

En tenant compte des résultats obtenus pour les échantillons congelés et lyophilisés, sans addition de cryoprotecteurs, nous remarquons que le DMSO et le Glycérol ont globalement le même effet sur les deux méthodes de conservation pratiquées et qu'ils permettent l'augmentation de la résistance de la souche à la congélation et à la lyophilisation pendant les deux mois de stockage (figures 10, 11). Le saccharose par contre, semble exercer un effet plus bénéfique pour la survie des souches lyophilisées que pour celle des souches congelées (figure 12).

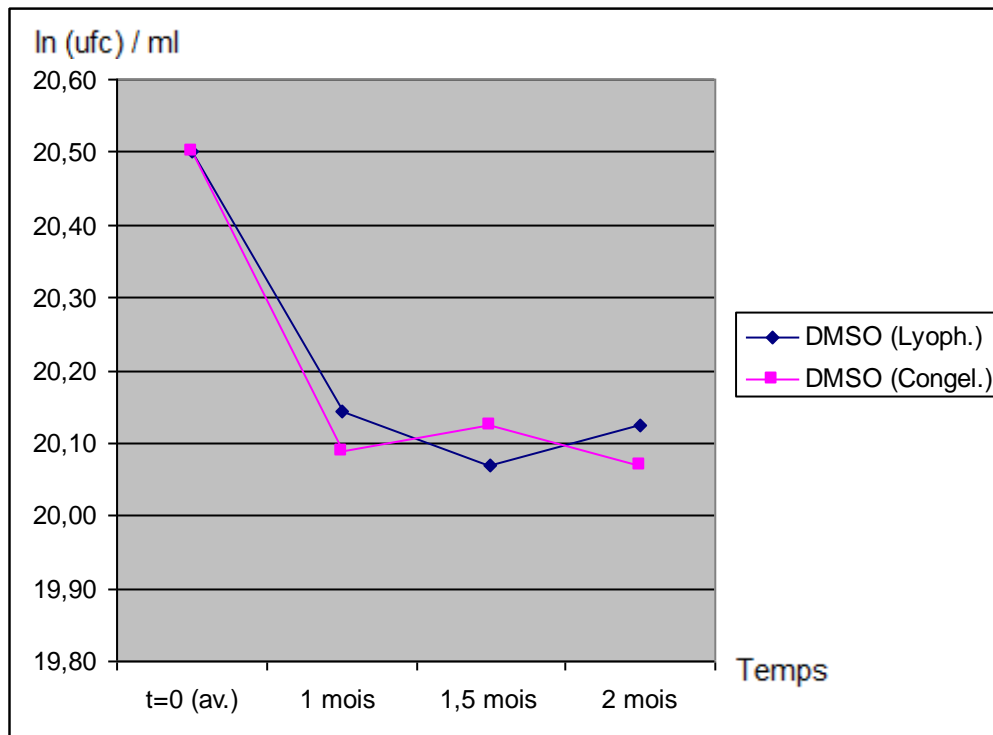


Figure 10: Effet comparatif du DMSO sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation

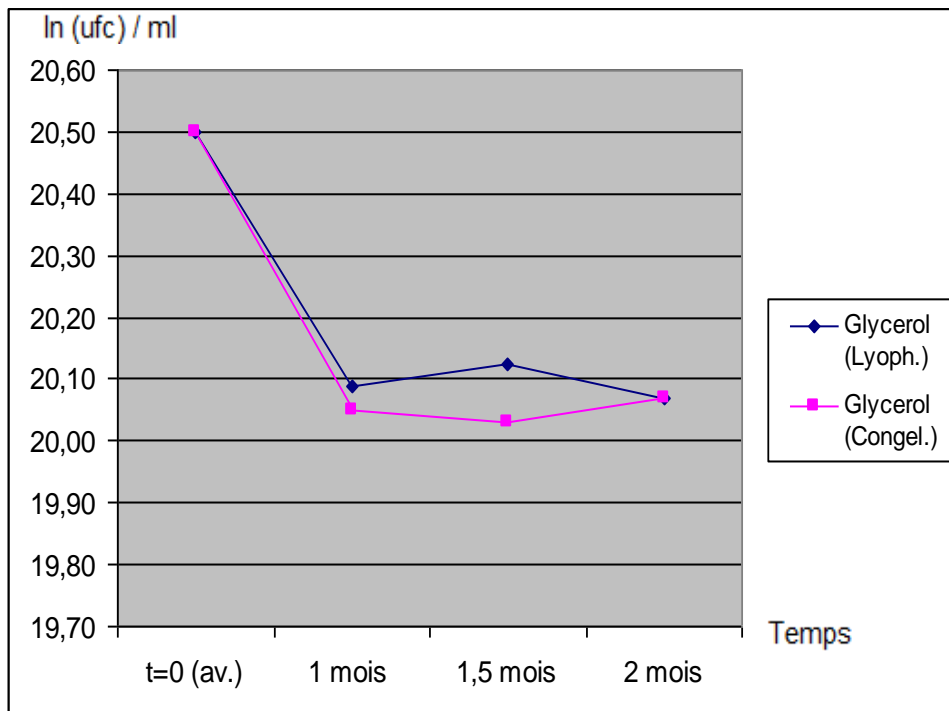


Figure 11 : Effet comparatif du glycérol sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation

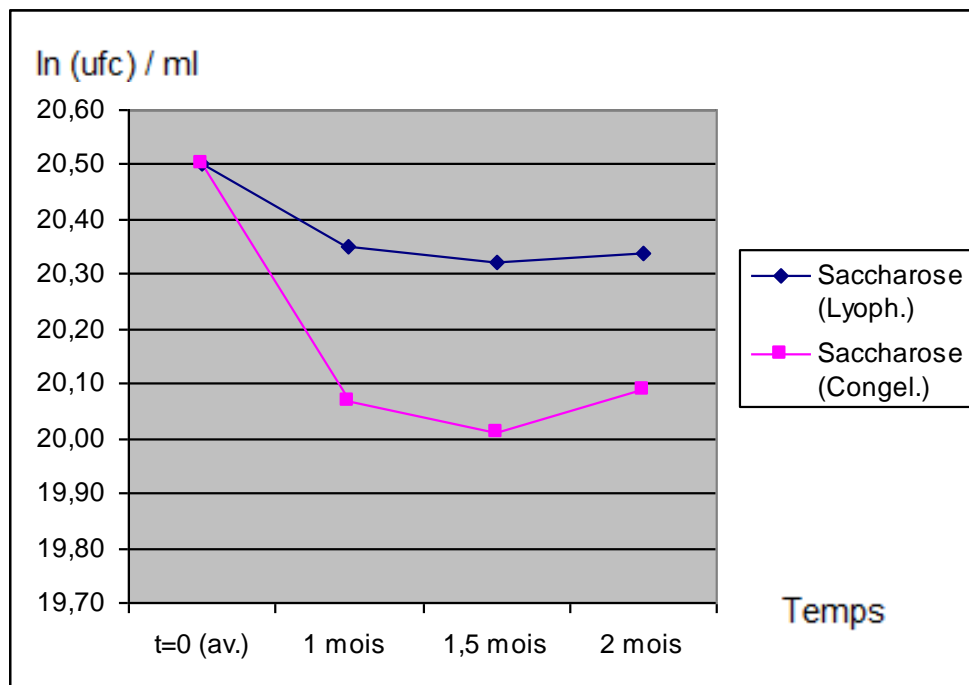


Figure 12: Effet comparatif du saccharose sur la viabilité de la souche durant deux mois d'entreposage, selon les deux méthodes de conservation

La plus traditionnelle classification des cryoprotecteurs (MERYMAN, 1971) dépend du taux de pénétration. Ceux qui pénètrent rapidement, généralement 30 min, incluent le glycérol et le DMSO, ceux qui pénètrent plus lentement et ceux qui sont imperméables, causent la cryoprotection extracellulaires lorsqu'ils sont présents à des concentrations de 10 à 40%. La perméabilité de certains de ces solutés (exemple : le glycérol) dépend nettement de la température et du type cellulaire. Quelques cryoprotecteurs intracellulaires peuvent être considérés comme étant des composés moins perméables sous certaines conditions. En plus, certains cryoprotecteurs pénètrent seulement dans la paroi cellulaire et dans la membrane cytoplasmique. Donc, trois catégories de ces additifs peuvent être distinguées (HUBALEK, 2003) :

- les cryoprotecteurs pénétrant dans la paroi et dans la membrane (glycérol et DMSO) ;
- les cryoprotecteurs pénétrant dans la paroi mais pas dans la membrane (saccharose) ;
- les cryoprotecteurs ne pénétrant ni dans la paroi ni dans la membrane (polysaccharides).

Le glycérol, triolcool, est un petit soluté, poly-hydroxylé d'un poids moléculaire égal à 92.09 (HUBALEK, 2003 ; FULLER, 2004). Hydrosoluble, il présente une faible toxicité durant une courte période d'exposition aux cellules vivantes et peut réagir avec des liaisons hydrogène de l'eau (FULLER, 2004). Ce composé est largement utilisé en microbiologie. L'effet cryoprotecteur du glycérol a été découvert bien avant celui des autres. KEIT (1913) a observé que l'addition de 5 à 42 % de glycérol à une suspension d'*E. Coli* dans l'eau permet la survie à long terme de cette bactérie à -20 °C. Le glycérol non dilué ou bien à 50% est adopté en routine pour la préservation des procaryotes pathogéniques et des virus à une température entre 4 et -20°C avant les années 1950. Après, le glycérol est appliqué à des concentrations entre 2 et 55%, pour la congélation des virus, des bactéries, des champignons et des levures (HUBALEK, 2003).

Le DMSO classé parmi les sulfoxides (le groupe S-O dans les molécules sulfoxide est presque chimiquement inerte), possède un poids moléculaire égal à 78.13. Il est introduit dans la cryobiologie car il est très efficace. Pénétrant rapidement, il est considéré comme un cryoprotecteur universel. Le DMSO possède aussi des propriétés radioprotectrices pour les microorganismes. Il a été originalement utilisé pour la protection des globules rouges et des spermatozoïdes mais aussi pour la cryopréservation des virus, des bactéries, des champignons et des levures (HUBALEK, 2003).

Le saccharose est un disaccharide de poids moléculaire égal à 342.30. Il a été souvent utilisé pour la préservation des microorganismes à des concentrations de 1 à 68%. L'effet

cryoprotecteur de ce disaccharide est découvert par KEITH (1913) qui a observé une survie à long terme des cultures de *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Proteus*, et *Micrococcus spp* congelées avec 10% de saccharose à -10 °C. Le saccharose est aussi cryoprotecteur pour les virus à diverses concentrations.

La différence de perméabilité des cryoprotecteurs affecte le mécanisme par lequel ils exercent leur effet protecteur. Ces agents peuvent assurer la protection par la position intracellulaire ou extracellulaire. Tous les cryoprotecteurs efficaces sont fortement hydrophiles grâce à la présence de groupes chimiques formant des liaisons hydrogènes, en particulier l'hydroxyle, le sulfoxyde, le carboxyle. Ainsi, plusieurs cryoprotecteurs peuvent protéger les microorganismes et leurs protéines contre le séchage (PICHUGIN, 1993).

Les cryoprotecteurs perméables (glycérol, DMSO) rendent la membrane cytoplasmique plus plastique et fixent l'eau intracellulaire. Ils préviennent ainsi la déshydratation excessive, réduisent la toxicité causée par le sel et empêchent la formation des cristaux de grande taille dans la cellule. Les cryoprotecteurs perméables stimulent la structure de fins cristaux de glaces et forment un type de gel vitreux donc préviennent les dommages hyperosmotique (effet de la solution) et les lésions de surface qui sont causées par le NaCl (HUBALEK, 2003) Par exemple : Le glycérol réduit les dommages de la membrane et la paroi des cellules congelés dans une solution saline (CALCOTT et MACLEOD, 1975). Quelques additifs augmentent la perméabilité membranaire qui peut être bénéfique à une congélation lente.

L'activité inhibitrice de la croissance de 10% de DMSO est observée avec certains genres et espèces bactériennes, telles que staphylococcus, micrococcus, pseudomonas, streptococcus, lactococcus, corynebacterium, et *E. coli*) (FOMIN et al, 1973). Le DMSO peut interagir électrostatiquement avec les couches phospholipidiques. Plus récemment, la capacité de récupérer l'oxygène des radicaux libres par le DMSO a été suggéré comme un facteur qui améliore l'action des cryoprotecteurs (BENSON et BREMNER, 2004).

Le glycérol et le DMSO, en général sont avantageux pour la préservation de la survie de *Lc. lactis* C2 et *Lc. cremoris* R1 congelés et stockés à -23.3°C mais possède un faible effet sur la survie de *Lc. diacetylactis* DRC2 (GIBSON et al., 1966).

Les cryoprotecteurs semi perméables, tel que le saccharose, induisent une déshydratation partielle des cellules avant la congélation. Ils concentrent entre la membrane cytoplasmique et la paroi comme une couche de tampon qui agit contre la croissance des cristaux de glace et protège la membrane mécaniquement (HUBALEK, 2003). Les sucres sont capables de fournir une bonne protection pour les bactéries durant la lyophilisation. Le saccharose possède une protection significative de *Lb. brevis* et *Lc. oenos* après lyophilisation, qui garde la survie des

Lb. brevis 40% (ZHAO et ZHANG, 2005). Il a été démontré également que les sucres notamment le saccharose permettent de stabiliser les membranes durant l'exposition hypertonique lors de la croissance de cristaux de glace, par interaction avec les groupes polaires des phospholipides (FULLER, 2004). Ils remplacent la structure de l'eau dans les membranes après déshydratation et préviennent le déploiement et l'agrégation des protéines par formation des liaisons hydrogènes avec les groupes polaires des protéines (HANAFUSA 1985; CARPENTER et *al.*, 1990). En effet, les performances des sucres en matière de cryoprotection sont liées à leur capacité de se combiner avec l'eau et par conséquent à leur opposition à la formation de cristaux intra et extracellulaires (ZHAO et ZHANG, 2005).

Le glycérol peut devenir un cryoprotecteur extracellulaire selon GILMOUR et *al* (1978) ; BEAL et *al* (2001). Ces cryoprotecteurs imperméables s'adsorbent à la surface de microorganismes où ils forment une couche visqueuse et cause une fuite partielle de l'eau à partir de la cellule. Ils inhibent ainsi, la croissance des cristaux par l'augmentation de la viscosité de la solution, et garde la structure des glaces amorphes serrés à proximité de la cellule. Les agents imperméables protègent donc principalement contre la formation des glaces extracellulaire (HUBALEK, 2003).

Les cryoprotecteurs perméables (glycérol, DMSO) et ceux imperméables (saccharose) protègent la surface lipopolysaccharidique d'*E. Coli* contre les dommages de congélation SMIRNOVA et AVTUSHENKO (1988). Des travaux ont montré que le glycérol, le DMSO et le saccharose sont actifs en surface et exerce leur effet sur la partie aqueuse de la monocouche de lipides (HUBALEK, 2003).

L'évaluation théorique quantitative de l'efficacité des cryoprotecteurs a été suggérée par NASH (1966) qui a essayé d'expliquer leur action par combinaison de paramètres basés sur la capacité de moduler la liaison d'hydrogène et sur l'interaction avec la molécule d'eau. Il a pu dériver un coefficient de protection $Q = V \times S$, où V est la volatilité et S la solubilité molaire.

Ce coefficient, doit fournir une indication d'une bonne activité de cryoprotecteurs ($Q > 1$). Il est aussi difficile de développer les calculs de Q pour prendre en considération les effets connus des polymères de poids moléculaire élevés. Les groupes donneurs et accepteurs d'hydrogène évidemment jouent un rôle significatif dans la capacité de la substance à protéger, pourtant il est très difficile ou bien parfois impossible jusqu'à présent de prévoir l'activité actuelle d'un cryoprotecteur spécifique. Par conséquent le meilleur cryoprotecteur et sa concentration optimale par un microorganisme particulier, reste à déterminer empiriquement par essai et erreur (HUBALEK, 2003).

Conclusion

Conclusion

L'isolement, des « souches d'intérêt » à partir du lait camelin, la maîtrise de la conservation de leur viabilité par l'une des deux méthodes de concentration ayant fait l'objet de la présente étude, pourraient contribuer à la création d'un soucier camelin indispensable pour une meilleure régularité des fabrications et pour la réalisation en routine de l'ensemencement direct de ce lait, si l'on envisage sa transformation en produits dérivés.

Dans la présente étude, nous avons isolé, purifié et cultivé une souche « acidifiante » appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Nous avons constaté que cette souche a une particularité de résister à une concentration de 6,5% de NaCl et que la cinétique de sa croissance est comparable à celle des espèces bovines.

Les résultats montrent l'efficacité de la lyophilisation et de la congélation à un moindre degré, sur la conservation de la souche étudiée lors d'un entreposage de deux mois. La numération bactérienne et la détermination du taux de survie de la souche en fonction de la méthode de concentration appliquée et en fonction de l'absence ou de la présence de cryodessiccateurs, met parallèlement en évidence l'importance de l'addition de ces additifs au milieu de concentration. En effet, les trois cryoprotecteurs utilisés ont permis l'amélioration de la viabilité durant le stockage de la souche conservée par les deux méthodes pratiquées.

On a remarqué aussi que la souche isolée présente une bonne aptitude à survivre durant le stockage, quelle soit congelée ou lyophilisée, même sans cryoprotecteurs. Toutefois, les meilleurs résultats sont enregistrés pour les échantillons lyophilisés contenant du saccharose pour lesquelles le taux de survie atteint 99.20 %.

La présente étude constitue une ébauche de travail, qui pourrait être d'un grand intérêt pour la filière lait camelin, si elle venait à être créée. Cette étude nécessite cependant, d'être approfondie par :

- des essais de conservation par d'autres types de substances cryoprotectrices ;
- l'isolement, la purification et la culture d'autres souches d'intérêt (aromatisantes, gazogènes, bifidogènes...), en testant leur résistance vis-à-vis de la congélation et la lyophilisation et en complétant le soucier ;
- mise au point de mélanges compatibles (cultures mixtes), en utilisant par exemple *Lactobacillus bulgaricus* qui stimule l'activité de *Streptococcus thermophilus*, dans ce cas, l'intérêt serait double si l'on veut fabriquer du yaourt à base de lait de chamelle, à l'échelle pilote voire industrielle : produit de haute valeur nutritive, et intéressant pour les « intolérants aux lactose »...

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- ABDEL-MONEIM E.S.; ABDALLA A.I. et AHMED E.E. (2006).** Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 321-328.
- ABDEL-RAHIM A.G. (1987).** The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelus dromedarius*) and goat (*Capra hircus*) milk. *World Rev. Anim. Prod.*, **23**, 9-11.
- 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. (1996).** Comparision of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.*, **79**, 366-371.
- ABU-TARBOUSH H. M.; AL-DAGAL M.M. et AL-ROYLI M.A. (1998).** Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.*, **81**, 354-361.
- ACCOLAS J.P. ; HEMMED. ; DESMAZEAUD M.J.; VASSEL I. ; BOUILLANCE C. et VEAUX M.C. (1980).** Les levains lactiques thermophiles : propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*, **60** :487- 254.
- AGRAWAL R. P.; SWAMI S. C.; BENIWAL R.; KOCHAR D. K.; SAHANI M. S.; TUTEJA F. C.; GHOURI S. K. J. (2003).** Effect of milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled study. *J.Camel Res. Pract.*, **10**, 45-50.
- ALAIS C. (1984).** Science du lait: Principes des techniques laitières IVe éditions. Paris: Ed. SEPAIC.814 p.
- ALPHONSE M. ; JOSÉ D. ; ALAIN B. (2004).** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés, Editions Doin, 430 pages.
- AMRANE A. (1991).** Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectuant la conversion en l'acide lactique de permeat de lactosérum supplémenté, Thèse de doctorat, Université de Rennes I-France, 152p.
- ANONYME 1. Pharmacopée européenne. Addendum (2000).** Contrôle microbiologique des produits non stériles (Recherche de microorganismes spécifiés). Solution et milieux de culture recommandés, 56-61.

- ANONYME 2. ISO 6785 / IDF 93. Mai (2001).** Lait et produits laitiers. Recherche de *Salmonella* spp.
- ANONYME 3. ISO 9232 / IDF 146. Février (2003).** Yaourt. Identification des micro-organismes caractéristiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*).
- ANONYME 4 XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier (2004).** Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.
- AUSSEL X. (2002).** Etude de bactéries lactiques isolées du shubat. Rapport de stage au CIRAD-AMIS, BTSA industrie agroalimentaire.
- AXELSSON L. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (Ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.
- BAUMANN D. P. et REINBOLD G. W. (1964).** Preservation of lactic cultures. *J. Dairy Sci.* 47:674.
- BEAL C. ; FONSECA F. et CORRIEU G. (2001).** Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* Is Related to Membrane Fatty Acid Composition. *American Dairy Science Association.* 84:2347–2356.
- BEAL C. ; MARIN M. ; FONTAINE E. ; FONSECA F. et OBERT J. P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 661-785.
- BEN-AISSA M. (1989).** Le dromadaire en Algérie. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires (02)*, 19-28.
- BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. (1994).** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- BEG O.U. ; BAHR-LINDSTRÖM H.V. ; ZAIDI Z.H. et JÖRNVALL H. (1987).** Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Febbs L.*, **216**, 270-274.
- BENSON E.E. et BREMNER D. (2004).** In *Life in the Frozen State*, (Eds) BJ Fuller, NJ Lane & Benson. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 205-242.

- BEKHOUCHE F. et BOULAHROUF A. (2005).** Études quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie* c – n°23, pp. 38-45.
- BERGY (2004).** Manuel de la systématique bactérienne. Ed RE Buchanan and N.E Gibbons, 600 P.
- BOUDJEMA K. (2008).** Essai d'optimisation de la production d'aide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*, Thèse de magister en biologie, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès, Algérie, 111 pages.
- BOURGEOIS C.M. et LARPENT G.P. (1996).** Microbiologie alimentaire T2 ; Aliments fermentés et fermentation alimentaire. Ed Technique et Documentation, 523p.
- BOURGEOIS C.M. et LEVEAU JY. (1991).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires : contrôle microbiologique ; 3, Ed Technique et documentation, 523 P.
- BRASHEARS M. M. et GILLILAND S. E (1995).** Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. *J. Dairy Sci.* 78:2326– 2335.
- BRENNAN M.; WANISMAIL B.; JOHNSON M. C. et RAY B. (1986).** Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Prot.* 49:47–53.
- CAILLET A. ; RIVOIRE A. ; GALVAN J.M. ; PUEL F. ; FEVOTTE G. (2007).** Crystallization of Monohydrate Citric Acid. Part 1: In situ monitoring through the joint use of Raman spectroscopy and image analysis. *Cry. Gr. Design.*, 7, 2080-2087.
- CALCOTT P.H. et MACLEOD R.A. (1975).** The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage, *Can. J. Microbiol.* 21: 1960–1968.
- CARPENTER. J.F., CROWE. J.H. AND ARAKAWA. T. (1990)** Comparison of the solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried states. *J Dairy Sci* 73, 3627–3636.
- CARPENTER J.F.; PRESTRELSKI S.J. et ARAKAWA T. (1993).** Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 456-464.
- CASTRO H. P.; TEIXEIRA P. M. et KIRBY R. (1995).** Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:172– 176.

- CHAMMAS G.I.; SALIBA R. et BÉAL C. (2006).** Characterization of the fermented milk - Laban with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* **71**: S156–S162.
- CHAMPAGNE C.P.; GARDNER N.; BROCHU E. et BEAULIEU Y. (1991).** The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can Inst Sci Technol J* **24**, 118–128.
- CHOUVENC P. ; VESSOT S. ; ANDRIEU J. et VACUS P. (2004).** Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. *Drying. Technol.*, **22**, 1577-1601.
- CLEGG J.S. (1986).** The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents. The _water replacement hypothesis_. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* ed. Leopold, A.C. pp. 169–187. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- 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.
- CORRERA. A. (2006).** Dynamique de l'utilisation des ressources fourragères par les dromadaires des pasteurs nomades du parc national du banc d'Arguin (Mauritanie). These de doctorat du muséum national d'histoire naturelle discipline : ecologie et gestion de la biodiversité. museum national d'histoire naturelle de paris. 362p.
- COTTIN M. G. (2000).** Les animaux domestiques dans les sociétés pastorales nomades : Rôles économique et socioculturel. *Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Thèse n° 26* : 74 p
- CROWE J.H. et CROWE L.M. (1986).** Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* ed. Leopold, A.C. pp. 188–209. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- CSONKA L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Revue. Microbiol.*, **53**, 121-147.
- CUVIER. (1835).** Leçons d'anatomie comparée. Paris (France) : *Crochard* ; 691p.
- DA CRUZ A. G. ; FARIA J. A. F. et VAN DENDER A. G. F. (2007).** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International* **40**, 951-956.
- DALY C.; FITZGERALD G. F.; O'CONNOR L. et DAVIS R. (1998).** Technological and health benefits of dairy starter cultures. *International Dairy Journal* **8**, 195-205.
- DE ANGELIS M. et GOBBETTI M. (2004).** Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics*. **4**, 106-122.

- DE BEER T.R.M.; BAEYENS W. R.G.; OUYANG J.; VERVAET C. et REMON J.P. (2006).** Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. *The Analyst.*, **131**, 1137-1144.
- DE FABREGUES P. (1989).** Le dromadaire dans son milieu naturel. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, n°1 : p 127-132.
- DENIS F. et PLOY M.C. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles Elsevier Masson, 573 pages.
- DE ROISSART H. et LUQUET F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.
- DESMAZEAUD M. (1990).** Lait Milieu de culture, Microbiologie, Aliment, Nutrition, 8: 313-325.
- DIALLO B.C. (1989).** L'élevage du dromadaire en Mauritanie. *Options Méditerranéennes – Série Séminaires- n° 2* : 29- 32.
- ELAGAMY 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.
- ELAGAMY E.I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68: 277-232.
- EL-AMIN F.M. et WILCOX J. (1992).** Composition of Majaheim camels. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3155-3157.
- ELKHIDIR H.E. (2002).** Vitamin C status in Sudanese camels. PhD Thesis, University of Utrecht (The Netherlands), 98 p.
- 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.
- 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. (1993).** Composition and Characteristics of Camel Milk ; review. *J. Dairy Res.*, **60**, 603-626.
- FRANK J. F. et HASSAN A. N. (1998).** Starters cultures and their use. *In* Marth, E. H. et Steele, J. L. (ed.). *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 131-172.
- FAYE B. (1997).** Guide de l'élevage du dromadaire Libourne : *SANOFI*, - 126 p in CD ROM.
- FAYE, B. (2002).** L'élevage du dromadaire dans le Monde. *Cours Approfondi sur le développement de l'élevage camelin*. Rabat, Maroc, 4-15 mars 2002.
- FAYE, B. (2003).** Performances et productivité laitière de la chamelle : les données de la littérature « lait de chamelle pour l'Afrique ». Atelier sur la filière laitière cameline en Afrique. Compte rendu de la FAO, Niamey.
- FOMIN D.C.; ALYCHEVA I.S. ; VESELOVSKAYA L.I. et TATCHIN S.M. (1973).** Antibacterial properties of dimethylsulphoxide (in Russian), in: *Khimioterapia infektsiy i lekarstvennoyustoychivosti patogennykh mikroorganizmov*, Moskva, pp. 63–64.
- FONSECA F. et CORRIEU G. (2001).** *Cryoprotection and freezing influence on acidification activity of thermophilic lactic acid bacteria. Relationships between biologic and thermodynamic properties*. Thèse de doctorat : Institut national agronomique Paris-Grignon, Paris (France).
- FONSECA F.; MARIN M. et MORRIS G. J. (2006).** Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects. *Appl Environ Microbiol.* 2006 October; 72(10): 6474–6482.
- FOSCHINO R.; FIORI E. et GALLI A. (1996).** Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. *J. Dairy Res.* 63:295–303.
- FRANK J. F. et HASSAN A. N. (1998).** Starters cultures and their use. *In* Marth, E. H. et Steele, J. L. (ed.). *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 131-172.
- FRENEY J. ; RENAUD F. ; LECLERQ R. et RIEGEL P. (2007).** Précis de bactériologie clinique, 2^{ème} éd., Editions ESKA, Paris, 1764 pages. Voir notamment le chapitre 4 (pages 67-108).
- FULLER B.J. (2004).** cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *cryoletters* 25(6) 375-388
- GAUTHIER-PILTERS H. (1981).** The camel. Its evolution, ecology, behaviour and relationship to man. *University of Chicago press*, Chicago (USA) ; 1-208.

GEVERS D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

GIBSON C. A.; LANDERKIN G. B. et PAMELA M. (1966). Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage. *applied microbiology*, july, vol. 14, no. 4.

GILMOUR M. N.; TURNER G.; BERMAN R. G. et KRENZER A. K. (1978). Compact Liquid Nitrogen Storage System Yielding High Recoveries of Gram-Negative Anaerobes. *applied and environmental microbiology*, p. 84-88 Vol. 35, No. 1.

GUIRAUD JP. (1998). Microbiologie alimentaire, Edition : DUNOD, 615p.

HAJNA A.A. (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* 49: 516-517.

HANAFUSA J.V. (1985). The hydration of water and protein with cryoprotectant. In *Fundamentals and Applications of Freeze-Drying to Biological Materials, Drugs and Food Stuffse.* pp. 59–62. Paris: International Institute of Refrigeration.

HANS J.B.; DONALD B.E.N. et RICHARD G.J. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant. Cell.*, 7, 1099-1111.

HASAIN O.; ZADI-KARAM H. et KARAM N-E. 2008. Phenotypique identification and propeties of lactic acid bacteria isolated from three breads dromedary raw milks in south Algeria. *Emir. J.Food Agric.*20(1): 46-59.

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.

HAUSMAN D.S.; CAMBRON R.T. et SAKR A. (2005). Application of on-line Raman spectroscopy for characterizing relationships between drug hydration state and tablet physical stability. *Int. J. Pharm.*, 299, 19-33.

HEY J. M. et MACFARLANE D. R. (1998). «Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics». *Cryobiology.*, 37, 119-130.

HOLZAPFEL W.H.; HABERER P.; GEISEN R.; BJÖRKROTH J. et SCHILLINGER U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 365S–73S.

HOLZAPFEL W. H. (2006). Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks, *Int. J. Food Microbiol.* 107: 1 – 11.

HUBALEK Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205–229.

HUGENHOLTZ J.; SYBESMA W.; GROOT M. N.; WISSELINK W.; LADERO V.; BURGESS K.; VAN SINDEREN D.; PIARD J.C.; EGGINK G. J.; SMID E.; SAVOY G.; SESMA F.; JANSEN T.; HOLS P. et KLEEREBEZEM M. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 217-235.

IN'T VELD G.; DRIESSEN A. J. M. et KONINGS W. N. (1992). Effect of unsaturation of phospholipid acyl chains on leucine transport of *Lactococcus lactis* and membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**:31–39.

ISMAÏL M.D. et AL-MUTAÏRI 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.

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).

JOFFIN J.N. et LEYRAL G. (2001). Microbiologie Technique¹, Dictionnaire des techniques, 3eme édition, France, 314.

KACEM M.; ZADI-KARAM H. et KARAM N.E. (2003). Identification of lactic acid bacteria isolated from milk and fermented olive oil in western Algeria. *Actes Inst. Agron.Vet. (Maroc)*, vol. 23(2-4):135-141.

KAMOUN M. et BERGAOUI R. (1989). Un essai de production et de transformation de lait de dromadaire en Tunisie. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **42**, 113-115.

KAMOUN M. (1990). La production de fromage à partir du lait de dromadaire. *Option médit.*, **12**, 119-124.

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 qualitatifs et aptitude à la transformation. In Tisserand J.-L. (ed.) *Elevage alimentation du dromadaire = Camel production and nutrition*. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, p. 81-103. (Option Méditerranéennes : Etudes et Recherche, n°13). Séminaire du Projet CEE-DGXI TS2*0233-C (EDB), 1992/10/09-10, Douz (Tunisia).

- KARAM-ZADI H. et KARAM N. (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *TROPICULTURA*, **24**, 3, 153-156.
- KEITH S.C. (1913).** Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water, *Science* 37: 877-879.
- KETS E.P.W.; CALINSKI E.A.; WIT M.; DE BONT J.A.M. et HEIPIEPER H.J. (1996).** Mannitol: a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.*, **178**, 6665-6670.
- KHANNA N.D.; SAHANI M.S. et RAI A.K. (1998).** The camel as a milk animal in Indian experience. Dans *Dromadaires et chameaux, animaux laitiers: actes du colloque de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994, Collection Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 95-100.*
- KHEDID K.; FAID M.; MOKHTARI A.; SOULAYMANI A. et ZINEDINE A. (2009).** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in moroco. *Microbiological Research* 164, 81-91.
- 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. Atelier Int. Sur le lait de chamelle en Afrique. FAO-CIRAD-KARKARA, Niamey (Niger), 5-8/11/03.
- KONUSPAYEVA G. ; LOISEAU G. et FAYE B. (2004).** La plus-value santé du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan - p. 47-50, *In : Onzièmes rencontres autour des recherches sur les ruminants.* - Paris : Institut de l'élevage.
- KOVACS L.G.; BALLATI P.A.; KROSHMAN H.B. et PUEPPKE S.G. (1995).** Transcriptional organisation and expression of nolXWBTUV. A locus that regulatecultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA 257. *Mol. Microbiol.* **17**: 923-933.
- LAI M.C.; SOWERS K.R.; ROBERTSON D.E.;ROBERTS M.F. et GUNSALUS R.P. (1991).** Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria . *J. Bacteriol.*, **173**, 5352-5358.
- LANGELLA P. ; NOUAILLE S. ; COMMISSAIRE J. ; BOLOTINE A. ; GRUSS A. et LE LOIR Y. (2001).** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* **81**, 19-28.

- LARPENT J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire, Technique & Documentation, 1041P.
- LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMED M.A. (1986).** Analysis of the Casein in Camel (*Camelus dromedaries*) milk . *J. Agric. Res.*, **16** , 13-18.
- LEJARD F. ; BOYAVAL P. ; DE ROISSART H. et MARUEJOULS R. (1994).** Production de ferments concentrés pour ensemencement direct. *In* De Roissard, H. et Luquet, F. M. (ed.). *Bactéries lactiques*. Lorica, Uriage, 539-553.
- LESLIE S.B.; LIGHTHART I.B.; CROWE J.H. et CROWE L.M. (1995).** Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3592-3597.
- LHOTE H. (1987).** Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et au Sahara. Ed. *Office National des approvisionnements et des services Agricoles- Alger* ; 161 p.
- LOISEAU G. ; FAYE B. ; SERIKBAEVA A. et MONTET D. (2001).** Enzymes ability to serve as markers of pasteurized camel milk. *Int. Conf. On new horizons in biotechnology*, 18-21 avril 2001, Trivandrum, Inde.
- LONGO H.F.; CHELMA A. et OULED- BELKHEIR A. (1989).** Quelques aspects botaniques et nutritionnels des., pâturages du dromadaire en Algérie. *Options Méditerranéennes – Série Séminaires - n. 2* : 47-53
- LONVAUD-FUNEL A. et DESENS C. (1990).** Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Incidences des conditions de culture. *Sci. Aliment.* 10:817–829.
- MALONGA M. (1985).** étude de la fabrication des yaourts en république populaire du Congo. essais d'améliorations, thèse de doctorat de troisième cycle spécialité: sciences alimentaires, l'université de Clermont II, 174p.
- MARCHAL N. ; BOURDON J.L et RICHARD C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs, Paris, 482 pages.
- MARUEJOULS A. et CAIGNIET A. (1983).** Les cultures concentrées congelées. *La Technique Laitière* **976**, 38-43.
- MÄYRÄ-MÄKINEN A. et BIGRET. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. *In* Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102
- 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.; 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.
- MERYMAN H. T. (1968).** Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8:173–183.
- MERYMAN H.T. (1971).** Cryoprotective agents, *Cryobiology* 8 173–183.
- MERYMAN H. T. (1974).** «Freezing injury and its prevention in living cells». *Annu Rev Biophys Bioeng.*, **3**, 341- 363.
- MOHAMED M.A.; LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMUD M.A. (1990).** Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, **45**, 716-718.
- MUKASA-MUGERWA. E.** 1985. Le chameau : étude bibliographique. *CIPEA*, ADDIS-ABEBA ;118p.
- NASH T. (1966).** Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing, in: H.T. Meryman (Ed.), *Cryobiology*, Academic Press, London-New York, pp. 179–211.
- NIKKILA P.; JOHANSSON T.; ROSENQVIST H. et TOIVONEN L. (1996).** Effect of pH on growth and fatty acid composition of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59:245–257.
- NOVEL G. (1993).** Les bactéries lactiques in: *Microbiologie industrielle ; les microorganismes d'intérêt industriel*. Ed Technique et Documentation. Lavoisier, 614p.
- NOVIK G. ; SIDARENKA A. ; RAKHUBA D. et EMILYA K. (2009).** cryopreservation of bifidobacteria and bacteriophages in belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *journal of culture collections volume 6, 2008-2009, pp. 76-84.*
- ONER M.D. ET ERICKSON L.E. (1986).** Anaerobic fermentation of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on 3% non fat dry milk pur and mixed culture, *Biotechnology Bioengineering*; **28**, 883-894.
- OUADGHIRI M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine, Thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire, UNIVERSITÉ MOHAMMED V – AGDAL FACULTÉ DES SCIENCES, Rabat, 132p.
- OUEDRAOGO S. L. ; SOMDA I. ; WONNI I. et SERÉ Y. (2007).** étude de la résistance au flétrissement bactérien de lignées inter- et intraspécifiques de riz de bas-fonds en conditions d'infestation artificielles. *african crop science journal*, vol. 15, no. 4, pp. 191 – 199.

- OUWEHAND A. C. ; SALMINEN S. et ISOLAURI E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279-289.
- PALASZ A. T. et MAPJETOFT R. 1. (1996).** «Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances». *Biotechnol Adv.*, **14**, 127-149.
- PATRIGNANI F.; LANCIOTTI R.; MATHARA J. M.; GUERZONI M. E. et PAUL ROSS R.; MORGAN S. et HILL C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* **79**: 3 – 16.
- PEGG D.E. et DIAPER M. P. (1988).** «On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes». *Biophys.*, **54**, 471-488.
- PEGG D.E. (2002).** The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, **20**, 5-13.
- PEYRE DE FABREGUES.(1989).** Le dromadaire dans son milieu naturel. *Rev. Elev. Méd. vét. Paystrop.*, n°1 : p 127-132.
- PICHUGIN YU.I. (1993).** Results and perspectives in searching of new endocellular cryoprotectants, *Probl. Cryobiol.* 2: 3–8.
- POT B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In* Corrieu, G. et Luquet, F.-M. (ed.). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1-152.
- PRAT M.L. (1993).** L'alimentation du dromadaire. Thèse de Doctorat vétérinaire *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort* ; n° 113 : 111 p.
- PRESCOTT L.M.; HARLEY J.P. et DONALD A. (2003).** Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française. **128** : 28-29.
- RAMET J. P. (2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.
- RODRIGUEZ J. M. ; MARTINEZ M. I. ; HORN N. et DODD H. M. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 101-116.
- RÜEGG M.W. et FARAH Z. (1991).** Melting Curves of camel milk fat. *Milchwissenschaft*, **46**, 361-362.
- RUAS-MADIEDO P.; HUGENHOLTZ J. et ZOON P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 163-171.

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. Rapport de stage au CIRAD-SAR et ENSIA. Diplôme de Mastère Grandes écoles. Montpellier. 45 p.

SAJBIDOR J. (1997). Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17:87–103.

SALEY M. 1993. La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Ed Maison-Alfort, Paris.

SAMELIS J.; MAUROGENAKIS F. et METAXOPOULOS J. (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology.* 23: 179-196.

SMIRNOVA L.F. et AVTUSHENKO S.S. (1988). Modes of cryoprotectant action on *Escherichia coli* cells (in Russian), *Mikrobiologia* 57 494–498

SMITTLE, R. B., S. E. GILLILAND, M. L. SPECK, AND W. M. WALTER. 1974. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Appl. Microbiol.* 27:738–743.

SANDERS, J.M.; VENEMA J. et KOK J. (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 23, 483–501. Sinha, R.N., Shukla, A.K., Madan Lal, and Ranganathan, B. (1982) Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. *J Food Sci*47, 668–669.

SAWAYA W.N.; SAFI W.J. et SHALHAT A.F. (1984). “Chemical composition and nutritive value of goats milk”, *J. Dairy. Sci.*, **67**, pp. 1655-1659.

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.; KHORCHANI T.; DJEGHAM .M et BELHADJ O. (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* 05(2) 293 - 304

SCHMIDT J. L et LENOIR J. (1972). **Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques**, Laboratoire de Recherches de la Chaire de Technologie (I.N.R.A.) Institut National Agronomique Paris-Crignon - Centre de Grignon (78) LE LAIT / SEPTEMBRE-OCTOBRE / N° 518, 536-557.

SCHUCK P. ; BOUHALLABA S. ; DURUPTB D. ; VAREILLEB P. ; HUMBERTB J.P. et MARIN M. (2004). Séchage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. *Lait.*, **84**, 243–268.

- SHALAEV E.Y.; JOHNSON-ELTON T.D.; CHANG L. et PIKAL MJ. (2002).** Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: implications for freeze-drying. *Pharm. Res.*, **19**, 195-201.
- SIBOUKEUR O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques Option : Sciences Alimentaires. Institut national agronomique el-harrach-alger.135p.
- SIMATOS D.; BLOND G.; LE MESTE M. et MORICE M. (1994).** Conservation des bactéries lactiques par congélation et lyophilisation. Pages 555–573 in Bactéries Lactiques, vol. II. H. de Roissart and F. M. Luquet, eds. Lorica, Uriage, France.
- SIMPKIN S.P. ; ROWLINSON P. ; TULLU D. et LESOROGOL P. (1997).** A comparison of two traditional camel calf management systems in Kenya and implications for milk production, *J. Camel Pract. Res.*, 4(2): 229-234.
- SINA L. (1992).** contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriquer par la soca, Thèse de doctorat en MEDECINE VETERINAIRES, université de dakar, 245p.
- SMITH D. (2001).** Provision and maintenance of micro-organisms for industry and international research networks. *Cryo Letters* **22**, 91-96.
- STREIT F. (2008).** influence des conditions de recolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolerance de *lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cfl1. Thèse pour obtenir le grade de docteur. L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech). Spécialité : génie microbiologique.226p.
- SULKIN E.S. et WILLET J.C. (1940).** A Triple Sugar Ferrous Sulfate Medium for use in Identification of Enteric Organisms. *J.Lab. Clin. Med.*, 25: 649-653.
- SUUTARI M. et LAAKSO S. (1992).** Temperature adaptation in *Lactobacillusfermentum*: Interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterculic acids. *J. Gen. Microbiol.* 138:445–450.
- TAMIME A. Y. et ROBINSON R. K. (1999).** Preservation and production of starter cultures. In Tamime, A. Y. et Robinson, R. K. (ed.). *Yoghurt: Science and Technology*. Woodhead publishing limited, Cambridge, England, 486-514.
- TANG X. et PIKAL MJ. (2004).** Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice, *Pharm. Res.* **21**, 191-200.
- TERRE S. (1986).** Propriete technologiques nutritionnel et physiologiques de: *Streptococcus thermophilus et lactobacillus bulgaricus*. *Technique laitière et marketing*, 1008 :26-36.

- TERZAGHI B.E. et SANDINE W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, **29**: 807-813.
- TEIXEIRA P. M.; CASTRO H. P. et KIRBY R. (1996).** Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**:34–38.
- TORRIANI S.; VESCOVO M. et DICKS L.M.I. (1997).** *Streptococcus thermophilus* and *lactobacillus delbruckii subsp bulgaricus*. A review annali di microbiologia. *Enzymologia*, **47**:29-52.
- TOURETTE I. ; MESSAD S. et FAYE B. (2001).** Interactions entre les pratiques de traite et la qualité sanitaire du lait de chamelle en Mauritanie. Atelier Int. Sur le lait de chamelle en Afrique. FAO-CIRAD-KARKARA, Niamey (Niger), 5-8/11/03.
- TSVETKOV T. et SHISHKOVA I. (1982).** Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology*. **19**:211–221.
- VANDAMME P.; POT B.; GILLIS M.; DEVOS P.; KERSTERS K. et SWINGS J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407.
- VIERLING E. (2008).** Aliments et boissons: filières et produits, Editions Doin, 277 pages.
- VIGNOLA C.L. (2002).** Science et technologie du lait: transformation du lait, Fondation de technologie laitière du Québec , Presses inter Polytechnique, 600 pages.
- WISSELINK H. W.; WEUSTHUIS R. A.; EGGINK G.; HUGENHOLTZ J. et GROBBEN G. J. (2002).** Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* **12**, 151-161.
- YAGIL R. et ETZION Z. (1980).** The effect of drought conditions on the quantity of camel's milk. *J. Dairy Sci.*, **47**: 159-166.
- YAGIL R. (1984).** The adaptation of domesticated animals to arid zones with special reference to the camel. *Refuah Veterinarith*, vol. 41, n° 4: 144-156.
- YATEEM A. ; BALBA MT.; AL-SURRAYAI T. ; AL-MUTAIRI B. et AL-DAHER. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International journal of dary science* **3**(4): 194-199.
- ZHAO G. et ZHANG G. (2005).** Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* **5**, 99, 333–338.

ZAMFIR M.; VANCANNEYT M.; MAKRAS L.; VANINGELGEM F.; LEFEBVRE K.; POT B.; SWINGS J. et DE VUYST L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 487–495.

Annexes

Annexe 1

Le milieu M17 (Ouadghiri, 2009)

- Tryptone.....2,50 g
- Peptone pepsique de viande2,50 g
- Peptone papainique de soja5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....2,50 g
- Extrait de viande5,00 g
- Lactose5,00 g
- Glycérophosphate de sodium19,00 g
- Sulfate de magnésium0,25 g
- Acide ascorbique0,50 g
- Agar bactériologique.....15,00 g

Annexe 2

GNO (gélose nutritif ordinaire) :

Peptone	10 g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g
pH :	7,2

Annexes 3

Mesure de PH (SINA, 1992)

- L'opération débute par l'étalonnage de l'appareil à l'aide de deux solutions à pH connus (6,87 et 4,01) à 25° C.
- L'électrode du pH-mètre est ensuite rincé à l'eau distillée puis séché avec du papier buvard.
- La température du produit est mesurée avec un thermomètre. Celle-ci est utilisée pour régler la température au niveau du pH-mètre.
- Ensuite on met le pH-mètre en marche et la valeur du pH s'affiche à l'écran de cet appareil.
- Immédiatement après usage, l'électrode est rincée puis séché.

Annexe 4

Test de la réductase (LARPENT, 1997)

- Homogénéiser l'échantillon par 25 agitations manuelles successives.
- En placer 10 ml de l'échantillon, aseptiquement, dans un tube stérile fermé par un bouchon stérile.
- Ajouter alors 1ml d'une solution standardisé de bleu de méthylène à 5 mg pour 100 ml d'eau.
- Après fermeture de tube, on le retourne une ou deux fois pour obtenir un mélange homogène du lait et du colorant.
- Placer dans un bain d'eau à 37°C et noter le temps de cette immersion (le niveau de l'eau du bain d'eau doit être supérieur à celui du lait dans le tube).

Décoloration en	Nombre de bactéries/ ml	Qualité du lait
5 heures ou plus	100 000-200 000	Bonne
2 à 4 heures	200 000à 2 millions	Bonne à passable
Moins de 2 heures	2 à 10 millions	Insuffisante

Annexe 5

Préparation des dilutions décimales

Technique de base (GUIRAUD, 1998)

- Prendre des tubes stériles dans les quels on pipette aseptiquement 9ml de liquide diluant.
- homogénéiser convenablement le produit à analysé (lait).
- prélever 1ml dans la suspension de départ à l'aide d'une pipette de 1ml.
- porter dans le premier tube de dilution (10^{-1}) (la pipette ne doit pas entrer en contacte ni avec les parois des tubes, ni avec le liquide diluant.
- avec une nouvelle pipette de 1ml, homogénéiser par aspiration et soufflement le contenu de ce tube (10^{-1}).
- ensemencer le tube (10^{-2}) et ainsi de suite en changeant à chaque fois de pipette pour ne pas perturber les dilutions (si une parti de la dilution prélevée doit être utiliser, on peut utiliser la même pipette à cette fin au même moment.

Annexe 6

Coloration de Gram :

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

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

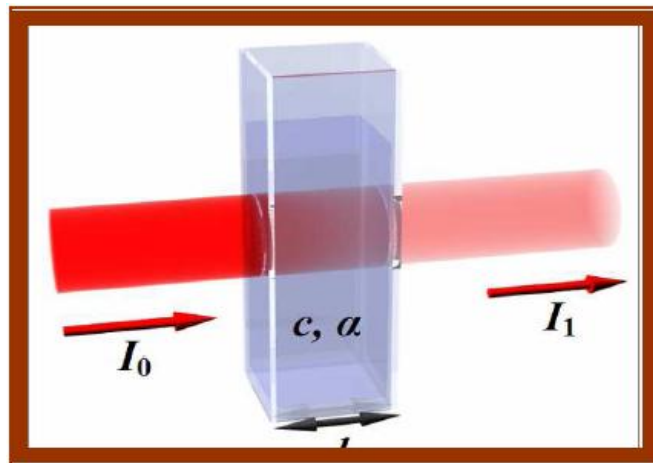
Annexe 7

Lait bleu de Sherman : lait au bleu de méthylène

Répartir le lait lait écrémé en tubes à essais (9 ml) Steriliser par tyndalisation : 3 chauffages à 100 °C 30 min à 24h d'intervalle. Au moment de l'emploi, ajouter par tube 1ml de bleu de méthylène 1% stérilisé 20 min à 120°C.

Test d'hydrolyse de l'amidon (OUEDRAOGO et *al.*, 2007). Une culture bactérienne de 24 heures est prélevée à l'aide d'une anse pour dessiner une figure serpentée sur le milieu d'amidon contenu dans une boîte de Pétri. Après incubation pendant 3-4 jours la boîte est inondé avec l'iode de lugole. L'apparition d'une couleur jaunâtre autour ou sous la culture bactérienne indique une réaction positive. Par contre, si le milieu vire au bleu ou si on obtient une coloration rougeâtre, la réaction est négative, donc l'amidon n'est pas hydrolysé.

Annexe 8



Avec $I_0 > I_1$

Principe de Beer Lambert (BOURGEOIS et LEVEAU, 1991)

Annexe 9



Les différents milieux de conservation