



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE 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

*Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine)
produites par *Lactococcus lactis subsp. lactis*, isolée
à partir du lait camelin*

Présenté par : M^{elle} SIBOUKEUR Amina

Devant le jury :

Président:	Mr. OULD-EL-HADJ M.D.	Professeur	U.K.M.Ouargla
Promotrice:	Mme SIBOUKEUR O.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla
Examinatrices:	Mme OULD-EL-HADJ- KHELIL A.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla
	Mme BISSATI S.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla

Année universitaire 2010-2011



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE 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

*Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine)
produites par *Lactococcus lactis subsp. lactis*, isolée
à partir du lait camelin*

Présenté par : M^{elle} SIBOUKEUR Amina

Devant le jury :

Président:	Mr. OULD-EL-HADJ M.D.	Professeur	U.K.M.Ouargla
Promotrice:	Mme SIBOUKEUR O.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla
Examinatrices:	Mme OULD-EL-HADJ- KHELIL A.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla
	Mme BISSATI S.	Maitre de conférences A	U.K.M.Ouargla

Année universitaire 2010-2011

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je remercie ALLAH de m'avoir aidé à le réaliser. Il m'est agréable de remercier, vivement, Mme SIBOUKEUR, Maître de Conférences A, du Département des SNV, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir proposé et dirigé ce travail. Je lui atteste ma gratitude pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, ses orientations et sa patience.

Je remercie Monsieur, le Professeur **OULD-EL-HADJ Mohamed Didi** du Département des SNV, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens à exprimer mes respectueux et sincères remerciements à Madame, **BISSATI Samia** Maître de Conférences A, du Département des SNV, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Kasdi Merbah Ouargla pour avoir accepté de porter un jugement à ce travail.

A Madame **OULD-EL-HADJ- KHELIL Aminata**, Maître de Conférences A, du Département des SNV, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Kasdi Merbah Ouargla, j'adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude pour ses conseils, ses orientations, son aide et ses sacrifices. Je tiens à la remercier également pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Mesdemoiselles, BOUAZIZ Sabrina, SAYAH Zineb, et BOUGHABA Latifa ainsi que tout le personnel du LAPEZASA et celui du laboratoire pédagogique, de la Faculté des Sciences, Université KASDI MERBAH- Ouargla, en particulier Madame IDDER Saida Messieurs BEGGARI El-Aich et MESSAITFA Noureddine et tout le personnel des laboratoires, de recherche et pédagogique pour leur précieuse aide.

Que Monsieur BA-BELHADJ. B., Docteur vétérinaire, soit assuré de ma gratitude pour sa collaboration et son aide dans la collecte des échantillons de lait camelin.











Je ne saurai oublier d'exprimer ma reconnaissance à Messieurs ZEKRI B. et DJEDDI I. /laboratoire de prévention de l'EPSP.

Je saisis cette occasion pour exprimer mon profond respect et ma reconnaissance à l'ensemble des enseignants de l'université et hors l'université Kasdi Merbah Ouargla, qui ont participé à ma formation graduée et post graduée.

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

Dédicace

Je dédie ce mémoire ;

-  *à la mémoire de mes grand- parents maternels et paternels ;*
-  *à mes très chers parents;*
-  *à mon adorable frère Abdallah ;*
-  *à mon fiancé Zoubir*
-  *à mes cousines DJENDOUCI Hadjer, HAFSI Wassila, SIBOUKEUR Khira, KHERFI Hadjer et SIBOUKEUR Fatma ;*
-  *à mes oncles et tantes paternels et maternels ;*
-  *au reste de ma famille ;*
-  *à mes amies surtout Amina, Saida, Djaouida et Asma ;*
-  *à mes enseignants*
-  *à toute la promotion Magister 2009-2011 /Option Microbiologie Appliquée du Département des SNV, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Kasdi Merbah Ouargla,*

 *SIBOUKEUR Amina*



Sommaire

Sommaire

Introduction	1
I. Partie bibliographique	4
1.1. Production de lait de chamelle	4
1.2. Caractéristiques physico-chimiques	4
1.3. Composition biochimique	5
1.4. Microbiologie du lait camelin	7
1.4.1. Système protecteur du lait camelin	9
1.4.2 Bactériocines	11
1.4.2.1. Bactéries lactiques productrices de bactériocines	12
1.4.2.2. Classification des bactériocines	13
1.4.2.3. La nisine	15
1.4.2.3.1. Mode d'action de la nisine	15
1.4.2.3.2 Lactococcus : producteurs de nisine	16
1.4.2.3.4. Caractères généraux	17
1.4.2.3.5. Habitat	17
1.4.2.3.6. Exigences nutritionnelles	17
1.4.2.3.7. Transport et métabolisme des sucres	18
1.4.2.3.8. Autres types d'inhibitions exercées par les Lactocoques	20
1.4.2.3.8.1. Inhibition par production de H ₂ O ₂	20
1.4.2.3.8.2. Inhibition par production d'acides organiques	20
1.4.2.3.8.3. Inhibition par production de diacétyle	20
1.4.3. Les staphylocoques : souche cible	21
1.4.3.1. Caractères généraux	21
1.4.3.2. Pouvoir pathogène	22
II. Matériel et méthodes	
2.1. Matériel biologique	24
2.1.1. Lait de chamelle	24
2.1.2. Lait de vache	24
2.2. Méthodes	25
2.2.1. Tests physico-chimiques	25
2.2.1.1. pH	25
2.2.1.2. Acidité Dornic	25
2.2.1.3. Densité	25
2.2.2. Analyse microbiologiques	25
2.2.2.1. Test de la réductase	25
2.2.2.2. Choix de la souche cible	26

2.2.3.Culture de la souche productrice de nisine et de la souche cible dans des milieux spécifiques (M17 / Chapman)	26
2.2.3.1.Préparation des dilutions	26
2.2.3.2. Diluant	26
2.2.3.3. Ensemencement	27
2.2.3.4. Identification des souches de <i>Lactococcus lactis subsplactis</i> et des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.2.3.4.1.Observations macroscopiques	30
2.2.3.4.1.1. Description des colonies	30
2.2.3.4.1.2.Test de la catalase	30
2.2.3.4.2. Observations microscopiques	31
2.2.3.4.2.1.Coloration de GRAM	31
2.2.3.4.3.Identification physicochimique et biochimique des <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	31
2.2.3.5..Purification des <i>Lactococcus lactis subsplactis</i>	31
2.2.3.6.Purification des <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.2.4.Optimisation des conditions de culture	32
2.2.4.1. Propagation de la souche	33
2.2.4.2. Culture de l'espèce productrice de nisine	33
2.2.4.3.Constitution des lots expérimentaux	33
2.2.5 Isolement de la nisine	34
2.2.6. Étude de l'activité antimicrobienne de la bactériocine à partir de surnageant	34
2.2.6.1. Test des puits	34
2.2.6.2. Test par la méthode des disques (diffusion en milieu gélosé)	36
2.2.6.3.Test des spots	37

III. Résultats et discussion

3.1.Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin	39
3.1.1. pH	39
3.1.2.Acidité Dornic	40
3.1.3. Densité	41
3.2.Analyses microbiologiques	42
3.2.1.Test de la réductase	42
3.2.2. Identification de la souche isolée sur M17	42
3.2.2.1.Observations macroscopiques	43

3.2.2.1.1.Description des colonies	43
3.2.2.1.2.Test de la catalase	44
3.2.2.2.Observations microscopiques	45
3.2.2.2.1. Examen à l'état frais	45
3.2.2.2.2.Examen après coloration de GRAM	46
3.2.2.3 Identification physicochimique et biochimique des souches isolées	46
3.2.3. Identification de l'espèce cible	49
3.2.4. Purification des souches	53
3.3.Optimisation des conditions de culture de la souche productrice	
3.3.1. Séparation de la biomasse	53
3.3.1.1. Mesure du pH des surnageants	53
3.3.1.1.1.Mesure du pH des surnageants de culture de Lc camelin en fonction de la durée d'incubation (SNCa et SNCb)	53
3.3.1.1.2.Mesure du pH des surnageants de culture de Lc bovin (SNBa et SNBb)	56
3.4.Neutralisation des SNC et SNB : étude de l'activité antimicrobienne de la bactériocine	57
3.4.1. Test des puits	57
3.4.2. Test des spots	58
3.4.3. Méthode des disques	59
3.4.3.1. Activité antibactérienne des SN	61
3.4.3.1.1.Activité antibactérienne des SNC	61
3.4.3.1.2.Activité antibactérienne des SNB	63
Discussion générale	65
Conclusion	69
Références bibliographiques	71
Annexes	

Liste des abréviations

- **3-PGA** : acide 3 - phosphoglycérique
- **aa** : acide aminé
- **AG** : acide gras
- **AGI**: acide gras insaturé
- **AGS**: acide gras saturé
- **Amy**: amygdaline
- **Ara** : arabinose
- **Asp** : aspartate
- **Aw** :Activity Water (activité en eau)
- **Cit** : citratase
- **DHAP** :dihydroxyacétone 3-phosphate
- **FBP** : fructose 1 ,6 diphosphate
- **G₆P** : Glucose – 6 phosphate
- **G6P** : Glucose 6 phosphate
- **GAP** : glycéraldéhyde 3 -phosphate
- **Glc** :Glucose
- **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ou peroxyde d'oxygène ou eau oxygénée
- **His** : histidine
- **Ig** : immunoglobulines
- **Ino**: inositol
- **Lactose-PTS** :système lactose- phosphotransferase
- **Lc** : Lactococcus
- **LF** :lactoferrine
- **LP** : lactoperoxydase
- **LZ** : lysozyme
- **Man** : mannitol
- **Mel** : mélibiose
- **MRSA** : *Staphylococcus aureus résistant* à la méthicilline
- **PEP- PTS** : système de phosphoenolpyruvate –phosphotransferase
- **PEP** : acide phospho-énol pyruvique

- **PP3** : composant-3- des protéose- peptones
- **ppm** : partie par million
- **Rha** : rhamnose
- **Sac** : saccharose
- **SN** : surnageant
- **SNB** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* bovin
- **SNC** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* camelin
- **SNBa** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* bovin incubée pendant 18 heures
- **SNBb** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* camelin incubée pendant 24 heures
- **SNCa** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* bovin incubée pendant 24 heures
- **SNCb** : surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* camelin incubée pendant 24 heures
- **Sor**: sorbitol
- **Staph**: staphylocoque
- **Système LPS** : système « Lactoperoxydase- Peroxyde d'hydrogène –Thiocyanate »
- **Voie EMP** : voie d'EMBDEN –MEYERHOFF- PARNAS
- **ZI** : zone d'inhibition

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Arbre d'évolution phylogénique des bactéries à Gram positive montrant la position des Lactococcus. Arbre est basée sur les séquences d'oligonucléotides de de l'ARNr16S	16
2	Représentation schématique de la voie de métabolisme du Glucose et des voies en aval du pyruvate chez <i>L. Lactis</i>	19
3	Procédure expérimentale	28
4	Culture de la souche productrice de nisine et de la souche cible dans milieux spécifiques (M17 / Chapman)	29
5	Procédure de culture des souches en vue de la production de nisine	35
6	Principales caractéristiques physico chimique du lait camelin en comparaison avec le lait bovin	39
7	Valeurs du pH des lots de surnageant(SNC)	55
8	Valeurs du pH des lots de surnageant(SNB)	55
9	Diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec la nisine cameline	62
10	Diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec la nisine bovine	62
11	Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la nisine cameline en fonction du pH du SN selon la durée	64
12	Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la nisine bovine en fonction du pH du SN selon la durée d'incubation	64

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Bactériocines produites par quelques bactéries lactiques	13
II	Échantillons de lait utilisés	24
III	Tests d'identification physico-chimiques et biochimiques des souches, après leur isolement	32
IV	Constitution des lots expérimentaux de culture de souche productrice de nisine	36
V	Lots expérimentaux de surnageant	36
VI	Mesure du pH des échantillons de lait camelin analysés	40
VII	Mesure de l'acidité Dornic des échantillons du lait camelin	41
VIII	Mesure de l'acidité Dornic des échantillons du lait bovin	41
IX	Mesure de la densité des échantillons du lait camelin	41
X	Densité des échantillons de lait bovin	42
XI	Description des colonies isolées à partir du lait camelin en milieu M17	44
XII	Description des colonies issues du lait bovin	44
XIII	Identification biochimique des souches isolées à partir du lait camelin et bovin	48
XIV	Diamètre de ZI	60

Liste des photos

Photo N°	Titre	Page
1	Colonie développées sur milieu M17	43
2	Souche de lactocoque après coloration de GRAM (lait camelin). G x100	46
3	Souche de lactocoque après coloration de GRAM (lait bovin). G x100	47
4	Croissance à pH 9.6	50
5	Type fermentaire	50
6	Croissance à pH 9.2	50
7	Croissance en présence de 2% deNaCl	50
8	Croissance en présence de 4% deNaCl	51
9	Croissance en présence de 6.5 % deNaCl	51
10	Culture sur lait au bleu de Scherham	51
11	Croissance à 40°C	51
12	Colonies issues du lait bovinensemencé sur milieu Chapman après coloration de Gram	52
13	Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> (G x 100)	52
14	Étude de l'activité antibactérienne de la nisine par le test des puits	58
15	Étude de l'activité antibactérienne de la nisine par le test des spots	59
16	Apparition des ZI par le test des disques (cas du s/lot 1b)	60

Résumé

Le lait camelin se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en lysozyme, en lactoperoxydase, en lactoferrine, en composant-3 des protéose-peptones (PP3), en acides organiques, en peroxyde d'hydrogène et en bactériocines produites par les bactéries lactiques. L'étude s'inscrit dans ce cadre et consiste à étudier d'une part, l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique isolée à partir de lait camelin ensemencé sur milieu M17, à l'égard d'une autre souche, pathogène isolée à partir d'un échantillon de lait, sur le milieu sélectif de Chapman et d'autre part, à évaluer son importance par rapport au système protecteur. Parallèlement une étude comparative a été effectuée avec le lait bovin. Des examens macroscopiques, microscopiques, ainsi que des tests physico-chimiques et biochimiques ont permis d'identifier la souche lactique productrice de nisine, comme étant une souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. D'autres examens macroscopiques et microscopiques, ont permis d'identifier la souche cible, comme étant une souche de *Staphylococcus aureus*. Une optimisation des conditions de production de nisine, par la souche productrice isolée puis purifiée par cinq repiquages successifs, a été réalisée. Pour se faire, nous avons procédé à la supplémentation du milieu M17 par du Glucose à 1% et /ou par des staphylocoques.

Les tests d'antagonisme de la nisine à l'encontre de la souche cible par les méthodes des puits et des spots n'ont pas donné de zones d'inhibition. Le test des disques a permis au contraire, de mettre en évidence la présence d'antagonisme. Ainsi, les résultats obtenus sont de nature à indiquer que la production de nisine par les souches de Lc camelins est plus grande en cas de stress de la souche, provoqué par addition de staphylocoques, pour une durée d'incubation de 18 h. De même qu'ils indiquent que la production cameline de nisine est relativement plus grande par rapport à celle bovine (\emptyset ZI = 8mm versus \emptyset ZI = 7mm). En relation avec la croissance, la production de nisine cameline semble maximale (\emptyset ZI = 8mm) avec une croissance minimale des Lc (pH 6,37). Un optimum de croissance des Lc camelins (pH 6,17) et un optimum de production de nisine (\emptyset ZI = 8mm) sont enregistrés pour une durée d'incubation de 24 heures,

Mots clefs : Lait, chamelle, Lactocoques, nisine, Staphylocoque, antagonisme

Abstract

Camel milk is different from other milks by the presence of a very powerful protective system, linked to relatively high rates in lysozyme, in lactoperoxidase, in lactoferrin, in component -3 of proteose-peptone (PP3), in organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins produced by lactic acid bacteria. The study falls into this context and is to study the one hand, the antibacterial activity of bacteriocins (nisin type) produced by lactic strain isolated from camel milk inoculated in M17 medium, against another strain, with its pathogen and isolated from a sample of milk, on the selective medium of Chapman and on the other hand, to evaluate its relative importance to the protective system. At the same time a comparative study was performed with bovine milk. Macroscopic and microscopic examination, and physicochemical and biochemical tests have identified the lactic strain producing nisin, as a strain of *Lactococcus lactis subsplactis*. Other macroscopic and microscopic examination, have identified the target strain, as a strain of *Staphylococcus aureus*. An optimization of nisin production conditions, by the producing strain isolated and purified by five successive subcultures, was performed. To do this, we performed supplementation of M17 medium with 1% Glucose and / or staphylococci.

Tests of antagonism of nisin against the target strain by the methods of wells and spots did not give inhibition zones. On the contrary, the discs test allowed, to highlight the presence of antagonism. Thus, the results are likely to indicate that the production of nisin by Lc camel strains is larger in case of stress of the strain, caused by the addition of staphylococci, for an incubation period of 18 h. Also they indicate that the production of camel nisin is relatively higher compared to bovine ($\text{Ø} = 8\text{mm}$ versus $\text{ZI } \text{Ø} = 7\text{mm}$). In relation to the growth, production of camel nisin appears maximum ($\text{ZI} = \text{Ø } 8\text{mm}$) with a minimum growth of Lc (pH 6, 37). An optimum growth of camels Lc (pH 6.17) and an optimum production of nisin ($\text{ZI} = \text{Ø } 8\text{mm}$) are registered for a period of incubation of 24 hours.

Keywords: Milk, camel, lactococcus, nisin, Staphylococcus, antagonism

ملخص

يتميز حليب النوق مقارنة مع أنواع الحليب الأخرى بوجود نظام حماية قوي جدا، مرتبط باحتوائه على معدلات عالية نسبيا من الليزوزيم (lysozyme)، اللكتوبروكسيداز (lactoperoxidase)، اللكتوفرين (lactoferrine)، ال-3 (PP3) الأحماض العضوية، بيروكسيد الهيدروجين وال bacteriocines المنتجة من طرف البكتيريا اللاكتيكية. هذه الدراسة تندرج في هذا السياق فهي من جهة تدرس النشاط المضاد للبكتيريا (نوع nisine) التي تنتجها سلالة من البكتيريا اللاكتيكية المعزولة من حليب النوق في وسط M17، ضد سلالة أخرى، ضارة معزولة من عينة من الحليب، و مزروعة في وسط خاص (milieu Chapman) ومن ناحية أخرى، تقيم أهمية هذا النشاط بالنسبة لنظام الحماية. في الوقت نفسه تم إجراء هذه الدراسة بالمقارنة مع حليب البقر. وقد حددت اختبارات الفحص المجهرية والفحص بالعين المجردة، والاختبارات الفيزيوكيميائية والبيوكيميائية نوع السلالة المنتجة للنزيرين (nisine)، أنها من نوع *Lactococcus lactis subsp. lactis*. كما أن اختبارات أخرى مجهرية وبالعين المجردة، حددت نوع السلالة المستخدمة في اختبار النشاط المضاد على أنها مكورات عنقودية ذهبية (*Staphylococcus aureus*). وقد أجري تحسين لظروف الإنتاج المثالية لـ nisine، من طرف السلالة المعزولة والمنقاة عن طريق النقل الخمسة مرات متتالية وذلك بإضافة كميات من الجلوكوز (1%) أو المكورات العنقودية الذهبية للوسط M17.

اختبارات النشاط المضاد للنزيرين (nisine) ضد السلالة المستهدفة (*Staphylococcus aureus*) باستعمال اختبار puits et spots لم يعطي مناطق كبح (zones d'inhibition) على العكس اختبار الأقراص (disques)، الذي أثبت وجود zones d'inhibition. أيضا، النتائج تشير إلى أن إنتاج nisine بواسطة البكتيريا اللاكتيكية المعزولة من حليب النوق يكون أكبر في حالة توتر السلالة المنتجة التي تحدثها إضافة العنقوديات، لفترة حضانة مدتها 18 ساعة. كما أنها تشير إلى أن إنتاج nisine من طرف البكتيريا اللاكتيكية لحليب النوق مرتفع نسبيا بالمقارنة مع nisine المنتجة من طرف البكتيريا اللاكتيكية لحليب الأبقار (Ø ZI = 8mm مقابل Ø ZI = 7mm). بالنسبة للعلاقة بالنمو فإن إنتاج nisine يظهر أقصى حد له (Ø ZI = 8mm) مع الحد الأدنى من نمو ال (pH 6,37). تم تسجيل معدل نمو الأمثل لـ Lc المستخرجة من حليب النوق (pH 6,17) والإنتاج الأمثل لـ nisine (Ø ZI = 8mm) أثناء فترة حضانة مدتها 24 ساعة.

كلمات المفاتيح: حليب، النوق، *Lactococcus*، nisine، المكورات العنقودية، نشاط مضاد



Introduction

Introduction

Le lait est un aliment indispensable pour la vie. Il constitue un produit de base dans le modèle de consommation algérienne. Malgré cela, la production laitière algérienne ne permet pas l'autosuffisance, car l'accroissement du cheptel arrive à peine à suivre l'évolution de la population (YAKHLEF,1989).Le lait représente environ 22 % des importations alimentaires totales du pays (AMELLAL,1995).L'Algérie représente ainsi, le deuxième importateur de lait et dérivés, après le Mexique.Une élévation de la croissance des importations laitières estimée à 57 % en moyenne par an,a été enregistrée entre 1996 et 2004 (SOUKI ,2009).Pour toutes ces raisons, l'Algérie a besoin de la moindre ressource en lait,en l'occurrence celle de la chèvre, de la brebis et de la chamelle particulièrement adaptée aux rudes conditions agro-climatiques du Sahara.

Le lait camelin, présente une composition en nutriments de base (protéines, lactose et acides gras) similaire à celle du lait bovin. En plus de cela, il se singularise par une teneur élevée en vitamine C (SIBOUKEUR, 2007) et en niacine (SAWAYA *et al.*, 1984) .Le lait est un milieu écologique renfermant une flore microbienne qui présente des caractéristiques importantes pour sa protection, sa fermentation.... Il s'agit de cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, elles ont pour principales caractéristiques d'être à GRAM positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate- réductase, ni cytochrome-oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les Glcides fermentescibles (DELLAGLIO *et al.*, 1994).Parmi cette flore, existent les coques tels que les *Streptocoques* et les *Lactocoques*, et les bacilles tels que les *Bifidobactéries* et les *Lactobacilles* (DELLAGLIO *et al.*, 1994).Quatre-vingt-une souches de bactéries lactiques, réparties entre quatre genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* ont été isolées à partir du lait de chamelle collecté dans le sud algérien(KARAM et KARAM, 2006).Ces microorganismes interviennent dans de nombreuses transformations du lait telles que la crème maturée, laits fermentés (leben), yaourts, fromages frais et affinés... .Elles participent également dans, la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie. La technologie laitière représente toutefois, le principal secteur d'application des bactéries lactiques(DESMAZEAUD et De ROISSART, 1994).

Ces dernières sont connues essentiellement, pour leur propriété de produire des substances antimicrobiennes, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des bactériocines (KLAENHAMMER *et al.*, 1994).

Durant l'entreposage du lait camelin à la température ambiante (fermentation spontanée), il a été constaté que le taux de bactéries lactiques augmentait et que celui des bactéries de contamination a tendance à diminuer (SIBOUKEUR, 2007). En d'autres termes, la flore lactique indigène interviendrait dans la protection du lait contre la flore contaminante, notamment l'espèce *Staphylococcus aureus*, agent causal des mammites (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008). A cet effet, la maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus* est un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008).

Étant donné, la vague de résistance aux antibiotiques des micro-organismes pathogènes et l'augmentation des infections dues à la résistance de *Staphylococcus aureus* (MRSA) et du genre *Clostridium*, il est intéressant de chercher de nouvelles substances antibactériennes pour lutter contre ces agents infectieux (JACK *et al.* 1995; REA *et al.*, 2009).

Beaucoup de travaux ont été consacré à l'activité antibactérienne des protéines lactosériques camelines, mais peu, se sont intéressés aux bactériocines produites par la flore lactique cameline.

Ce travail s'inscrit dans ce cadre et comporte quatre volets d'investigations complémentaires:

- 1- l'isolement, l'identification et la purification d'une souche de lactocoque à partir du lait camelin;
- 2- l'isolement, l'identification et la purification d'une souche de *Staphylococcus aureus*;
- 3- optimisation des conditions de culture de la souche pure de Lc en vue de la production de la nisine;
- 4- test de l'activité antibactérienne de la nisine produite, sur la souche cible (*Staphylococcus aureus*).

Une étude comparative avec le lait bovin est menée en parallèle.



7. Partie bibliographique

I. Partie bibliographique

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) joue un rôle socio-économique primordial dans les zones arides et semi-arides. Outre son exploitation comme animal de bât et de course, ses poils et sa peau sont utilisés dans la confection des vêtements, des chaussures, portefeuilles, des selles ... En outre, c'est un excellent pourvoyeur de protéines nobles telles que la viande et le lait. Dans ce contexte, il est important d'insister sur la capacité des chamelles à produire du lait même en conditions de sécheresse les plus sévères (YAGIL *et al.*, 1994 ; ADAMOU, 2009).

1.1. Production de lait de chamelle

La production mondiale de lait de chamelle a été estimée officiellement à 1,3 million de tonnes en 2002 (FAYE, 2003). Cependant, si l'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) (FAYE, 2003). 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 8 à 18 mois en général), soit des durées plus importantes en moyenne que les vaches laitières dans les mêmes conditions (FAYE, 2003). Les facteurs alimentaires et saisonniers influent sur ces performances. Les essais d'intensification, réalisés ici et là, ont montré les perspectives en production laitière de cette espèce pour approvisionner les populations des zones arides de l'Ancien Monde (Annexe 1), (FAYE, 2003).

La production nationale de lait de chamelle, vivant en extensif, varie de 0,5 à 10 kg de lait par jour avec une période de lactation moyenne de 14 mois, selon les conditions climatiques, et d'autres facteurs intrinsèques (rang de lactation, stade de lactation, nombre de traite, présence du chamelon ...) (SAIDI *et al.*, 1999 ; CHEHMA, 2003 ; SIBOUKEUR, 2007). Comparativement à la production mondiale qui est estimée entre 4.16 et 5 l/j pour une durée de lactation de 8 à 18 mois (FAYE, 2003, BEKELE *et al.* (2002) cité par SIBOUKEUR, 2007), la production nationale n'est pas négligeable.

1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait camelin, à l'observation visuelle est de couleur blanche. A la traite et lors des transvasements, il forme une mousse abondante à cause de sa teneur élevée en composant-3- des protéose-peptones (PP₃) par rapport au lait bovin (1.1 contre 0.3 g/l

respectivement)(SMAIL,2002). Selon(GIRARDET *et al.*,1995), le PP₃,agent moussant et émulsifiant (agent tensioactif) est caractérisé par une thermorésistance élevée.

La couleur du lait camelin est due à sa structure et à la composition de sa matière grasse relativement pauvre en β carotène (SAWAYA *et al.*,1989).Il est légèrement sucré, avec un gout acide, parfois amère et/ ou salé, selon la nature des plantes broutées (RAMET,2003 et ABDELRAHIM, 1987 in SIBOUKEUR ,2007) .Il présente un pH autour de 6.6 et 6.97 (KHASKHELI, 2005 ; BADAOUI 2000, SIBOUKEUR, 2007) ;une acidité titrable de l'ordre de 15° avec une viscosité moyenne de 2.2 centipoises. Son point de congélation varie entre -0.53 à -0.61°C (HASSAN *et al.*1987 in SIBOUKEUR ,2007)et sa densité se situe entre 1.022 à 1.032 (WANGOH *et al.* ,1998;CHERFI,2002).Toutefois, ces valeurs dépendent de certains facteurs, tels que le rang et le stade de lactation, la race, le type d'élevage, la saison de lactation. Cependant, l'alimentation reste le facteur le plus déterminant (RAMET, 1993 ; WANGOH *et al.* ,1998 ; MEHAIA *et al.*,1995in SIBOUKEUR ,2007)

1.3.Composition biochimique

Même si elle fluctue, selon les auteurs, donc selon les animaux et l'environnement, la composition biochimique globale du lait de chamelle montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait bovin (SIBOUKEUR, 2007).Les variations observées dans la composition de ce lait ont été attribuées à plusieurs facteurs, tels que les différentes procédures analytiques, l'emplacement géographique, les variations saisonnières, les conditions d'alimentation et la race des chameaux (AL HAJ et AL KANHAL ,2010)

Les protéines, source d'acides aminés essentiels, sont réparties selon leur solubilité à pH acide, en caséines et en protéines lactosériques. Les caséines insolubles à pH4.3 dans le cas du lait camelin et caprin (correspondant à leur pHi) sont de l'ordre de 33g/l (soit 2.5 - 4 %). Ces phospho-protéines constituent la fraction protéinique majoritaire du lait puisqu'elles représentent 73 à 81 % des protéines totales (MIETTON *et al.*1994 in SIBOUKEUR, 2007 ; BADAOUI ,2000). Les protéines lactosériques, possèdent une haute valeur nutritive et jouent un rôle important dans l'auto-épuration du lait puisqu'elles possèdent pour la plupart une activité protectrice contre les attaques extérieures (BARBOUR*et al.* ,1984 ; EL-SAYED *et al.*,1992) .

La teneur en lactose dans le lait camelin se situe entre 2.5 et 5.6% versus 4.8 à 5 % dans le lait de référence. Selon GNAN et SHEREHA,(1986) in SIBOUKEUR, (2007) ; BAYOUMI,(1990) in SIBOUKEUR, (2007), ces concentrations élevées en lactose, expliquent la saveur parfois sucrée du lait de chamelle.

La teneur en eau, varie en fonction de sa disponibilité dans l'alimentation. Pendant la période de sécheresse, elle atteint sa valeur maximale. D'une manière générale, elle est présente dans le lait en quantité suffisante pour couvrir les besoins du chamelon (YAGIL et ETZION,1980 in SMAIL ,2002). En cas de restriction des chameaux en eau alimentaire, le lait se traduit par une dilution (86%), dans un régime déficient, elle s'élève à 91% (FAYE et MULATO ,1991). Il semble que c'est un mécanisme d'adaptation au manque d'eau permettant de protéger le chamelon de la soif.

La composition en minéraux du lait de chamelle, est plus diversifiée que celle du lait de vache. La teneur en macro-éléments (sodium, potassium, calcium et magnésium) est presque similaire à celle du lait bovin alors que des concentrations plus élevées en oligo-éléments (fer, cuivre,zinc, fluor et plomb) ont été enregistrées pour le lait de chamelle (BOUDJENAH *et al.* ,2009).

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

Les caractéristiques de la matière grasse de ce produit se rapprochent de celle du lait humain.La matière grasse de couleur blanchâtre, du fait de son déficit en β carotène, est dispersée dans le lait sous forme de globules gras de petit diamètre (3 μ m versus 20 μ m pour le lait de vache) (SMAIL ,2002). Ce caractère rend la matière grasse plus digeste, comme dans le cas du lait humain. Cependant, il constitue une entrave à l'écémage donc à la technologie beurrière.

Selon MORRISON, (1968), GORBAN et IZZELDIN,(1999), GORBAN et IZZELDIN,(2001), les lipides simples prédominent sur les lipides complexes. Les triglycérides représentent 96 % des lipides totaux et parmi les stérides, les esters decholestérol

se trouvent avec une concentration de 9.98 mg/100g. Dans la fraction estérifiée du lait de chamelle, le pourcentage des AGS est égale à 52% dont 18.4% est composé d'acide palmitique (GORBAN et IZZELDIN, 1999). Ces AG prédominent. Pour les AGI, le lait camelin contient de l'acide oléique, et de l'acide palmitoléique. L'acide pelargonique (C₉:0) et l'acide décanoïque (C₁₀:1) ont été trouvés avec des quantités significatives dans le lait camelin contrairement au lait bovin. Les AG à courtes chaînes sont relativement peu présents (GORBAN et IZZELDIN, 1999).

1.4. Microbiologie du lait camelin

Le lait est un substrat renfermant des concentrations satisfaisantes en protéines, en Glcides, en lipides, en sels minéraux et en vitamines, pour la croissance cellulaire. Les microorganismes existant dans notre environnement, vont donc trouver dans ce bioproduit un substrat idéal pour leur développement. La présence de nombreux facteurs de croissance permet de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans un milieu moins complet (LARPENT *et al.*, 1997). Le lait contient peu de microorganismes (3000 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions et à partir d'un animal sain (GUIRAUD, 1998). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et bacilles. D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade, par exemple l'espèce *Staphylococcus aureus* issus d'un animal atteint de mammites. Ainsi, au cours de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine, le lait peut être contaminé par une grande variété de micro-organismes. Une partie seulement d'entre elles peut se multiplier dans ce bioproduit si la température est favorable et le milieu est propice (LARPENT *et al.*, 1997).

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

Il en résulte que la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variable d'un échantillon à l'autre et suivant l'âge du lait (LARPENT *et al.*, 1997).

Beaucoup de travaux se sont intéressés à la microbiologie du lait bovin, caprin et ovins, par contre peu d'entre eux ont porté sur celle du lait camelin. Parmi ces dernières, nous citerons :

- AL- MOHIZEA *et al.* (1994) qui en s'appuyant sur la numération de quatre groupes de micro-organismes (la flore aérobie totale, les psychrotrophes, les coliformes et les bactéries sporulantes), déduisent que la qualité hygiénique du lait camelin est satisfaisante ;
- YAGIL *et al.* (1994) ont montré que si les dromadaires du troupeau sont en bonne santé, la pasteurisation du lait de chamelle n'est pas indispensable ;
- BARBOUR *et al.*(1984) ont mis en évidence l'inhibition des bactéries pathogènes par le lait camelin. Ils attribuent cette activité antibactérienne à la présence de protéines protectrices (lysozyme, lactopéroxydase , lactoferrine...) ;
- DURHAIMAN (1988) a montré l'effet inhibiteur du lysozyme extrait et purifié à partir du lait camelin sur *Escherichia coli* et *Micrococcus lysodeikticus* en le comparant à celui de l'ovalbumine ;
- EL-SAYED *et al.* (1992) ont montré l'efficacité des protéines protectrices du lait camelin contre, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et rotavirus ;
- ABOU- TARBOUCH *et al.*,(1998) ayant travaillé sur quatre espèces de bactéries bifidogènes à savoir : *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, *B. longum* et *B. Angulatum*, suggèrent d'utiliser de la poudre du lait camelin comme milieu de préculture de cette flore à haut potentiel nutritionnel et thérapeutique (probiotiques) car cette dernière exige pour sa croissance la présence des acides aminés libres et de peptides comme source d'azote (prébiotiques) ;
- SIBOUKEUR *et al.*(2002) en isolant à partir du lait camelin des bactéries halotolérantes, des entérobactéries et des coliformes ont montré que leurs taux diminuaient durant les trois premiers jours de l'entreposage du lait à la température ambiante, alors que celui des bactéries lactiques a tendance à augmenter :il s'agit d'un effet autoépuratif puissant ;
- SIBOUKEUR (2007) a confirmé la présence de cet effet auto-épuratif particulièrement efficace et que le PP3 isolé par FPLC, possédait une action inhibitrice fortement prononcée contre les bactéries halotolérantes et assez peu prononcée contre les entérobactéries.

De ce qui précède, il en ressort, que le lait de chamelle possède un système protecteur spécifique, puissant contre la flore de contamination. Ce système est composé de substances antagonistes telles que des protéines protectrices (Lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine, PP3..), des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, et des bactériocines produites par les bactéries lactiques (BARBOUR *et al.* 1984 ; KLAENHAMMER *et al.*, 1994 ; SIBOUKEUR, 2007).

1.4.1. Système protecteur du lait camelin

❖ **Les acides organiques** excrétés par les bactéries lactiques assurent deux importantes fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (KASET, 1987 in KLAENHAMMER *et al.*, 1994). Ainsi, l'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les micro-organismes pathogènes qui exigent des pH neutres. D'autre part en condition acide, la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée, étant donné leur plus grande tolérance aux bas pH extra et intracellulaires (KLAENHAMMER *et al.*, 1994).

❖ **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** est connu depuis longtemps comme agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (PRICE et LEE, 1970, DHIVA et SPECK, 1969 in KLAENHAMMER *et al.*, 1994). Sa production peut avoir lieu selon plusieurs modes mettant en jeu des oxydases et probablement des superoxydedismutases (CODON, 1987 in KLAENHAMMER *et al.*, 1994).

❖ Selon EL-SAYED *et al.*, (1992), le **lysozyme** camelin a un effet inhibiteur seulement sur *Salmonella typhimurium* et ne présente aucun effet contre *Staphylococcus aureus*. Le LZ a un même spectre d'activité que celui de l'oeuf et présente une activité différente de celle du LZ bovin. Ce dernier inhibe la croissance de *Lactococcus cremoris* et n'a pas d'effet sur *Salmonella typhimurium*.

❖ **La lactoferrine** est présente en grandes quantités dans le lait des camélidés. C'est une protéine qui possède une activité antimicrobienne, antivirale, anti-inflammatoire et analgésique (KONUSPAYEVA *et al.*, 2003). Elle présente un effet inhibiteur similaire à celui du lait bovin. Cette activité inhibitrice est due au captage du fer nécessaire au développement des micro-organismes notamment celui de *E. coli*. . D'après REITER, (1983) in EL-SAYED *et al.*, (1992), les concentrations élevées en acide citrique dans le milieu diminuent l'activité inhibitrice de la LF. Puisque le lait camelin contient moins de citrate que le lait

bovin (EL- AGAMI,(1985) in EL-SAYED *et al.*,(1992), on peut supposer que sa LF a une activité inhibitrice plus élevée EL-SAYED *et al.* ,(1992).

❖ **La lactoperoxydase ou le système LSP**

L'activité de la LP cameline est similaire à celle du lait bovin (EL-SAYED *et al.*, 1992). Cette protéine enzymatique est très efficace contre l'activité et la croissance des micro-organismes nuisibles. L'efficacité de cette activité est d'autant plus importante que le lait renferme du soufre et du H₂O₂ donc que le système LSP est actif. C'est le cas du lait camelin riche en soufre provenant des plantes broutées (parcours sahariens). Le peroxyde d'hydrogène est formé avec l'oxygène dissout dans le lait. L'action du système LSP résulte de l'oxydation de l'ion SCN⁻ en présence du peroxyde d'oxygène, qui fait apparaître des oxyacides parmi lesquels l'hypothiocyanate (OSCN) serait un puissant inhibiteur (KONUSPAYEVA *et al.* ,2003). Ces derniers ont des propriétés bactéricides contre les bactéries à GRAM négatif mais bactériostatique contre les bactéries à GRAM positif (EL-SAYED *et al.*, 1992).

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines de faibles mobilité électrophorétique et ayant un poids moléculaire élevé. Ces protéines d'origine sanguine sont présentes dans les laits de toutes les espèces (DE WIT, 1998). Leur fonction est d'assurer la transmission de l'immunité de la mère à son petit. Chez les ruminants, les Ig de la classe G sont les plus dominants (ALAIS et LINDEN, 1997 in SMAIL, 2002).

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

❖ **Le PP3** camelin connu également sous le nom de « lactophorine » est un homologue du PP3 bovin. Il s'agit d'une phosphoglycoprotéine. Elle est composée de 135 résidus d'acides aminés (SORENSEN et PETERSON, 1993). Elle contient plus de sérine et de glycine que les protéose-peptones en général, par contre, elle contient moins de proline et de valine. Comme les protéose-peptones, ce composant contient peu d'acides aminés aromatiques (la cystéine et le tryptophane n'ont pas été déterminés (PAQUET *et al.*, 1982). Il se caractérise par son hydrophobicité élevée (PAQUET, 1989). Il exerce une action inhibitrice vis-à-vis des souches microbiennes de contamination du lait de chamelle (germes halotolérants entérobactéries pathogènes, entérobactéries totales). Les lactobacilles semblent résistants à l'action du PP3. Cela peut s'expliquer par la présence d'un seul site de O-glycosylation, permettant de reconnaître seulement la flore nuisible exogène (SIBOUKEUR, 2007).

- ❖ Le puissant système protecteur du lait camelin est renforcé par l'action des bactériocines produites par les bactéries lactiques, la nisine produite par *Lactococcus lactis*, en l'occurrence.

1.4.2. Bactériocines

Les bactériocines sont des protéines ribosomiales synthétisées et libérées dans le milieu extracellulaire. Elles sont douées d'une activité bactéricide à l'encontre d'espèces proches de la souche productrice (KLAENHAMMER *et al.*, 1994 ; HENG *et al.*, 2007 ; GONG *et al.*, 2009.). Elles agissent à très faible concentration, de l'ordre de la pico ou de la nanomole/l (PARADA *et al.*, 2007 ; RONGNE *et al.*, 2009). Ces molécules peuvent tuer ou inhiber la croissance des bactéries pathogènes qui se disputent la même niche écologique ou la même source d'éléments nutritifs : d'où leur importance dans les industries agroalimentaires. La structure de ces substances est résistante à l'autoclavage. En plus, elle est stable à pH combiné au traitement thermique, ce qui veut dire qu'elle pourrait être utilisée dans le cas de préparations subissant un traitement thermique pour la préservation dans l'industrie agroalimentaire (BAYOUB *et al.*, 2006). Contrairement aux antibiotiques, les bactériocines :

- ont un spectre d'activité relativement étroit;
- elles ne sont pas toxiques et sont rapidement digérées par les protéases dans le tractus digestif de l'homme (RILEY M. A. et WERTZ J. E., 2002 ; PARADA *et al.*, 2007) ;
- elles sont synthétisées ribosomiquement, contrairement aux antibiotiques, qui sont synthétisés par un système enzymatique unique;
- chaque bactériocine possède son propre déterminant immunitaire dont le gène est lié au gène de la bactériocine, alors que les déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques ne sont pas liés, et sont exprimés indépendamment des gènes codant pour la synthèse d'antibiotiques (NES *et al.*, 2002);
- les bactériocines sont généralement produites au cours de la phase de croissance et cessent de se produire à la fin de la phase exponentielle (WARDANI *et al.*, 2006). La production est souvent régulée par un système, bi-composant de régulation alors que les antibiotiques sont des métabolites secondaires produits au cours la phase stationnaire.

Les bactériocines ne sont pas fréquemment actives contre les bactéries à GRAM-négatif.

La famille des bactériocines comprend une diversité de protéines qui diffèrent par leur taille, les souches cibles, le mode d'action et des mécanismes de l'immunité (RILEY et WERTZ, 2002).

La plupart des premiers succès dans la définition de la nature des bactériocines a été liée à celle des bactéries à GRAM-négatif, en particulier les colicines, et une grande partie de cette connaissance est issue du travail de GRATIA et FREDERICQ. En 1925, GRATIA a décrit pour la première fois l'antagonisme entre des souches de *E.coli*. En 1946 FREDERICQ a utilisé des colicines mutées résistantes afin de classer les colicines (HENG *et al.*, 2007).

Une observation remarquable a été enregistrée en 1947 lors d'une enquête sur les bactériocines produites par les bactéries GRAM+. Cette observation montre que l'une des activités inhibitrices des lactocoques (Streptocoques du groupe N) contre d'autres bactéries lactiques est due à une molécule caractérisée comme substance protéique antimicrobienne appelée "substance inhibitrice du groupe N" ou nisine (MATTICK et HIRSCH, 1947 in HENG *et al.*, 2007).

Néanmoins, la bibliographie ne mentionne pas de travaux portant sur l'isolement des bactériocines à partir du lait camelin cru. BAYOUB a isolé des souches productrices de ces substances à partir du lait fermenté (Raib) (ALOUCHE *et al.*, 2010).

1.4.2.1. Bactéries lactiques productrices de bactériocines

Les bactériocines peuvent être produites par plusieurs bactéries à GRAM +, GRAM - et quelques Archea. Cependant, les travaux publiés portent sur la production des bactériocines par bactéries GRAM + particulièrement celles des bactéries lactiques (JACK *et al.* 1995)

Ces substances ont été trouvées dans toutes les grandes lignées de bactéries et, plus récemment, elles ont été décrites tels qu'elles sont universellement produites par certains membres de la Archaea. Selon KLAENHAMMER, 99% de toutes les bactéries peuvent élaborer au moins une bactériocine. Toutefois, peu de chercheurs se sont penchés sur cet aspect (RILEY et WERTZ, 2002). Le tableau I présente quelques bactériocines produites par quelques bactéries lactiques

Tableau I : Bactériocines produites par quelques bactéries lactiques (KLAENHAMMER *et al.*, 1994).

Espèces productrices	Bactériocine	Spectre d'activité	Caractéristiques
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Nisine	<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries à GRAM+ 	<ul style="list-style-type: none"> • Lantibiotique 3.5 kDa
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Diplococcine	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactococcus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Sans lanthionine 5.3 kDa
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacine B	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i> • <i>Lactobacillus helveticus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Purifiée, 6.3 kDa, formant un complexe de haut PM
<i>Leuconostoc</i>	Leucocine A-UAL187	<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries lactiques • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Protéinique, 2.5-3.0 kDa • Séquence de 37 aa • clonée
<i>Pediococcus</i>	Pédiocine A1	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pediococcus</i> • <i>Lactobacillus plantarum</i> • <i>Lactobacillus casei</i> • <i>Lactobacillus bifementans</i> • <i>Leuconostoc mesenteroides</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 16.5 kDa, liée à un plasmide, séquence de 44 aa

1.4.2.2. Classification des bactériocines

KLAENHAMMER *et al.*, (1994) ont classé les bactériocines en trois principales classes, en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (PM) et génétiques :

❖ **Classe I** : appelées « lantibiotiques » (lanthionine-containing antibiotic peptides) (TODOROV S. D., 2009). Ce sont des peptides de petite taille (<5 kDa), stables à la chaleur. Les Lantibiotiques agissent sur les structures membranaires. Elles sont profondément modifiées après traduction, ce qui conduit à la formation d'acides aminés caractéristiques (thioéther lanthionine et méthyllanthionine) (PARADA *et al.*, 2007).

La classe des lantibiotiques est divisée en deux sous-classes en fonction des similitudes structurelles :

- **Sous-classe I a** : elle inclue, les peptides flexibles et chargés positivement. Ils agissent généralement en formant des pores dans les membranes cytoplasmiques des souches cibles sensibles. La nisine est le prototypique lantibiotique(PARADA *et al.* ,2007).
- **Sous classe I b** : elles sont typiquement globulaires, plus rigides dans la structure et sont soit chargées négativement ou n'ont pas de charge nette. Elles exercent leur action en interférant dans les réactions enzymatiques essentielles des souches cibles(DEEGAN *et al.*,2006 in PARADA *et al.* ,2007)
- ❖ **Classe II.** : les Non-Lantibiotiques: ou « pediocin-like bacteriocins ». Ce sont des bactériocines de poids moléculaires variables, mais généralement de petite taille (<10kDa). Elles sont stables à la chaleur, hydrophobes et douées d'une activité cytolytique (KLAENHAMMER *et al.*, 1994; PARADA *et al.*,2007). Cette classe comprend trois sous classes:
 - **Sous classe IIa**: peptides actifs contre le genre *Listeria*. Les bactériocines caractéristiques qui représentent cette sous classe sont : la pediocine PA-1 et la sakacine P(PARADA *et al.* ,2007).
 - **Sous Classe IIb**: formée par un complexe de deux peptides distincts. Ces peptides ont peu ou pas d'activité et il semble n'y avoir aucune homologie de séquence entre les peptides complémentaires(PARADA *et al.*,2007). Dans ce groupe figurent la lactococcine G et la plantaricine EF e JK(PARADA *et al.* ,2007).
 - **Sous Classe IIc**: petits peptides, thermostables, qui sont transportés par un leader-peptides. Dans cette classe existe seulement la divergicine A et la acidocine B(PARADA *et al.* ,2007).
- ❖ **Classe III.** : des bactériocines de grande taille (>30k Da) sensibles (dénaturation thermique) et donc complexes quant à leur activité bactéricide et/ou leur structure protéinique (KLAENHAMMER *et al.*,1994; PARADA *et al.* ,2007).

1.4.2.3. La nisine

La nisine est un métabolite primaire et sa biosynthèse est fonction de la croissance cellulaire(PIARD et DESMAZEAUD, 1992 ; RAY, 1992 in DAOUDI ,2000 ; LE LAY, 2009). Elle est produite à l'état naturel par les *Lactococcus* trouvés dans des plantes vertes et dans le lait cru. Les gènes codant pour la biosynthèse de la nisine sont portés sur un

transposon qui est mobile et peut donc être localisé au sein du chromosome ou sur un plasmide. Onze gènes sont impliqués dans la production de la nisine. Ces gènes sont organisés en opéron(DAOUDI, 2000 ; CHEIGH *et al.*, 2005) Comparée avec d'autres bactériocines produites par les bactéries lactiques, la nisine possède un large spectre d'activité. Tous ces variants(A et Z) inhibent la plupart des bactéries à GRAM positif , à GRAM négatif et même les spores bactériens. Elle a un mode d'action bactéricide contre les bactéries GRAM-positives y compris les détériorants alimentaires comme le *Clostridium sp*, *Bacillus*,les micro-organismes pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, et ceux qui causent la mammite bovine *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus dysgalactiae*(RYAN *et al*, 1998 in PARADA *et al.* ,2007). Elle est également active contre les pathogènes humains comme les *Staphylococcus aureus* résistants à la methiciline (MRSA)(PARADA *et al.* ,2007).

Cette bactériocine est composé de 34 résidus amino-acyls. Ces deux variants diffèrent seulement dans l'acide aminé numéro 27(substitution de His dans la nisine A par Asp dans la nisine Z).Elleest principalement utilisée dans les aliments en conserve, les produits laitiers et particulièrement dans la production de fromage fondu et de fromage à tartiner.

A ce jour la seule, c'est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire pour le contrôle microbiologique et sanitaire de certains aliments lactés, carnés, et conserves. La nisine estthermostable, résistante à la trypsine et inactivée par l'alfa-chymotrypsine. Son spectre d'activité est très large ; elle inhibe la plupart des bactéries GRAM +,notamment *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* (RAIMBIAULT,1995, DAOUDI, 2000).

1.4.2.3.1.Mode d'action de la nisine

La nisine possède un double mode d'action antimicrobienne.Elle se lie aux lipidescomplexes (phospholipides), inhibe la synthèse de la paroi cellulaire, forme des pores au niveau de la membrane cytoplasmique de la souche cible *Staphylococcus aureus* en l'occurrenceet donc la dépolarise(ANONYME 1,2005 ; PARADA *et al.*,2007 ; GONG *et al*,2009 ;RAY ,1992 in DAOUDI, 2000)

1.4.2.3.2Lactococcus : producteurs de nisine

La première étude sur les lactocoques a été entrepriseen 1873 par Joseph LISTER. Ce chercheur avait tenté de prouver la théorie de Pasteur pour la fermentation lactique. Durant ses expériences, il a obtenu la première culture bactérienne pure.Il lui donna le nom de

« *Bacterium lactis* ». Ces bactéries sont plus tard renommées « *Streptococcus lactis* » par ORLA- JENSEN, (1919).

En se basant sur des investigations exhaustives, SCHLEIFER *et al.*, (1985) proposent de séparer les streptocoques du groupe N, des oraux, entérocoques et streptocoques hémolytiques et proposent le genre « *Lactococcus* » (TEUBER et GEIS, 2006).

La position des lactocoques dans l'arbre de l'évolution phylogénique des bactéries à GRAM +, montre leur séparation des streptocoques pathogènes (fig.1).

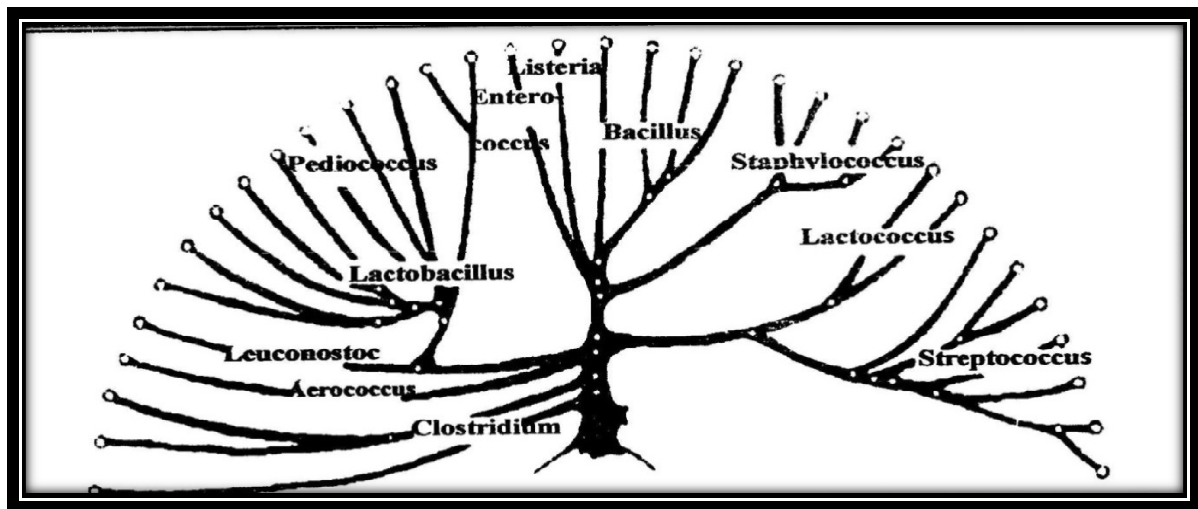


Figure 1 : Arbre d'évolution phylogénique des bactéries à GRAM +, montrant la position des *Lactococcus*. (Arbre est basé sur les séquences d'oligonucléotides de l'ARNr16S) (TEUBER et GEIS, 2006).

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

1.4.2.3.4. Caractères généraux

L'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* est une bactérie à GRAM positif, à catalase négative aéro-anaérobie facultative. Elle se trouve en forme de coques disposées en chaînes de longueur variable. Les cellules sont ovoïdes ou sphériques de 0.5 à μm de diamètre. Elle possède un métabolisme homofermentaire et produit exclusivement de l'acide lactique L(+). Comme tout le genre *lactococcus*, elle se caractérise par la présence d'antigène du groupe N, par son caractère faiblement α hémolytique et non β hémolytique, par sa température de croissance minimale inférieure ou égale à 10°C et optimale voisine de 30°C , par sa thermosensibilité et son inaptitude à croître en présence de 6.5% de NaCl et à pH 9.6. DELLAGLIO *et al.* (1994) ; TEUBER et GEIS (2006) ; KIM *et al.*, (1999) ont montré que l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* était résistante à l'acidité, à la bile, au sel et à la congélation.

1.4.2.3.5. Habitat

Selon CASALTA et MONTEL, (2007), le biotope des *Lactococcus lactis* est les plantes et la peau des animaux. Il faut considérer comme fondée, l'hypothèse selon laquelle leur présence dans le lait est due à une contamination qui se produit pendant la traite, et que le fourrage en représente la source principale. Les habitats les plus importants des *Lactococcus lactis* demeurent le lait, les laits fermentés et les fromages, où on les trouve en quantité dominante (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

1.4.2.3.6. Exigences nutritionnelles

Comme toutes les bactéries lactiques, l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* possède une faible aptitude biosynthétique. Cette souche exige pour sa croissance des acides aminés à savoir : la leucine, histidine valine Glutamate, isoleucine et la méthionine. Elle exige aussi, la présence de vitamines (vit B12, biotine...), des acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide oléique et des acides nucléiques, des cations tel que le magnésium et des sucres fermentescibles (DESMAZEAUD et De ROISSART, 1994 ; OLEIVERA *et al.*, 2005).

1.4.2.3.7. Transport et métabolisme des sucres

Lactococcus lactis subsp lactis présentent un métabolisme homofermentaire. D'après NEVES *et al.*, (2005), les sucres sont transférés au niveau de *Lactococcus lactis* par trois

méthodes : PEP- PTS, en se liant avec un ion (création d'un gradient d'ions) et transport ATPases. D'un point de vue bioénergétique, le système PTS est probablement le plus efficace.

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

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

Les *Lactococcus lactis* ont la capacité de fermenter divers monosaccharides, disaccharides, et occasionnellement des hexitols. La voie d'EMP sert dans tous les cas, de voie principale de dégradation des dérivés phosphorylés. Le Glucose subit une phosphorylation au cours de son transport par le système PEP-PTS et le G₆P accumulé est ensuite fermenté en acide lactique par la voie d'EMP. Le lactose est aussi métabolisé par fermentation homolactique, comme le Glucose (fig2) (THOMPSON et GENTRY-WEEKS, 1994).

Cependant d'autres sources d'énergie telles que le galactose, le maltose, le sorbitol, le mannitol etc..., peuvent produire, au cours de leurs fermentations, diverses quantités d'acétate, de formiate, de diacétyl, d'acétoïne et de 2,3 butandiol, tout comme l'acide lactique (fig2) (THOMPSON et GENTRY-WEEKS, 1994).

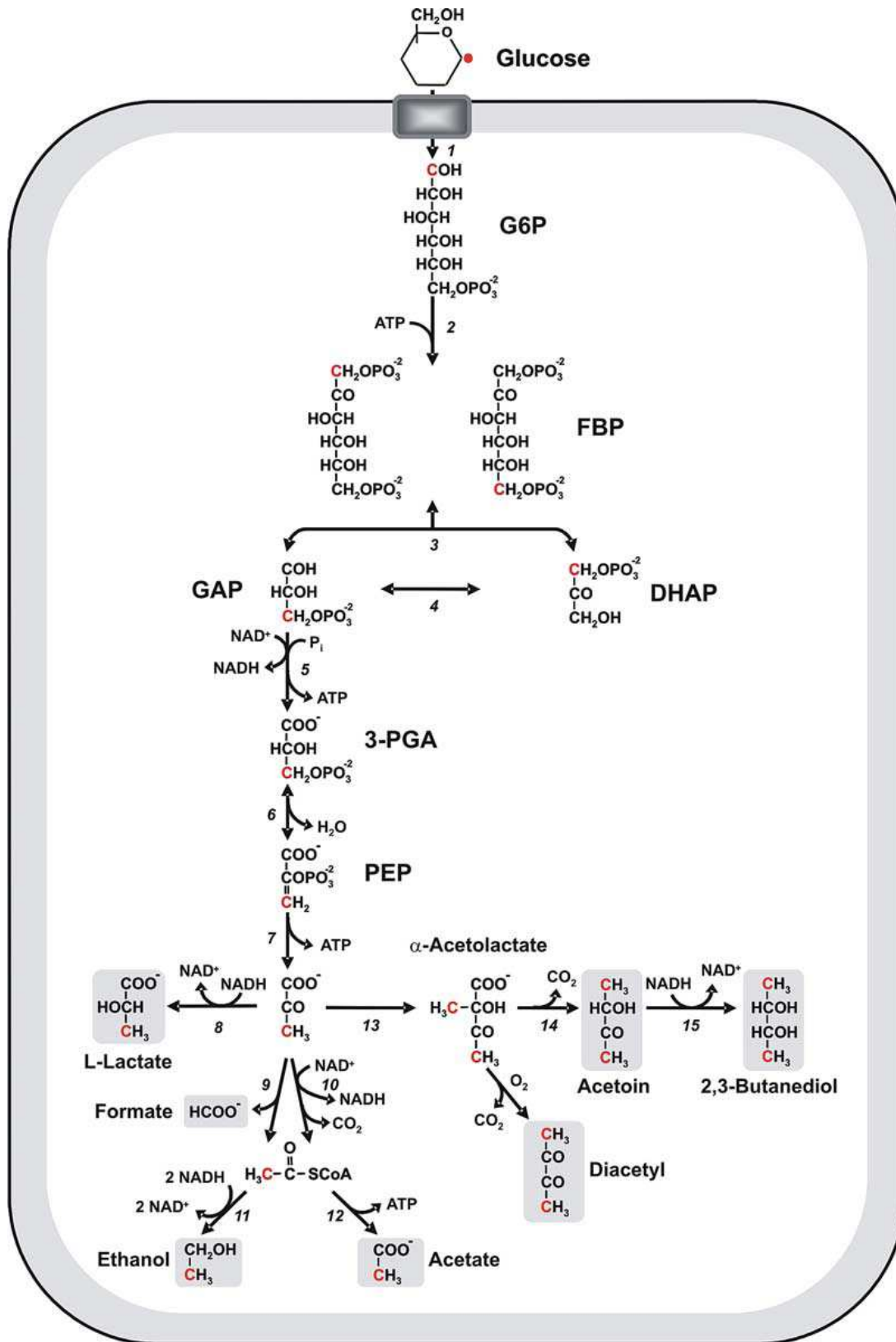


Figure 2: Représentation schématique de la voie de métabolisme du Glucose et des voies en aval du pyruvate chez *L. lactis* (NEVES *et al.*, (2005))

1.4.2.3.8. Autres types d'inhibitions exercées par les Lactocoques

D'autres inhibitions que les bactériocines produites par les Lc, sont à signaler. Ces différents types d'inhibition peuvent agir par synergie.

1.4.2.3.8.1. Inhibition par production de H₂O₂

Certaines bactéries lactiques produisent des quantités suffisantes de peroxyde d'hydrogène pour inhiber de nombreux micro-organismes indésirables. L'effet bactéricide de H₂O₂ a été attribué à son effet oxydant puissant sur les cellules bactériennes et à la destruction des structures moléculaires de base des protéines cellulaires (ZALAN *et al.*, 2005).

D'après ITO *et al.*, (2003), un filtrat acellulaire de *Lc. lactis subsp. lactis* qui contenait environ 350 ppm de H₂O₂, a montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*.

1.4.2.3.8.2. Inhibition par production d'acides organiques

Les acides, lactique et acétique excrétés par ces bactéries, sont les principaux accepteurs d'électrons et les produits terminaux du métabolisme fermentaire. Ces acides organiques assurent deux importantes fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme non dissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (KASHET, 1987 in KLAENHAMMER, 1994). Ainsi, l'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire. D'autre part, en condition acide, la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée, étant donné leur plus grande tolérance aux pH extra et intracellulaire (KLAENHAMMER, 1994).

1.4.2.3.8.3. Inhibition par production de diacétyle

Comme agent antimicrobien, le diacétyle est nettement plus efficace contre les bactéries à GRAM négatif, les levures et les moisissures, que contre les bactéries à GRAM + (JAY, 1982). Des concentrations de l'ordre de 200 µg/ml de diacétyle inhibent les bactéries à GRAM négatif et les levures. Les bactéries lactiques sont généralement inhibées par des concentrations plus élevées (350 µg/ml), alors que celles non lactiques à GRAM positif sont inhibées par des concentrations de 300 µg/ml (JAY, 1982).

1.4.3. Les staphylocoques : souche cible

Jusqu'en 1870, les *Staphylococcus* étaient connus comme agent causant des inflammations de la peau. Ils ne sont associés aux intoxications alimentaires qu'en 1884, année où VAUGHAN et STERNBERG ont isolé le germe d'un cheddar, lié à environ 300 cas d'intoxication alimentaire dans le Michigan. En 1914, la relation entre l'intoxication alimentaire et les toxines produites par les staphylocoques et la toxine produite par *Staphylococcus aureus* a été mise en évidence par BARBER sur des volontaires humains lors d'une épidémie causée par le lait, aux Philippines (ELLIOT, 2001).

1.4.3.1. Caractères généraux

L'espèce *Staphylococcus aureus* est une bactérie à GRAM positif, de 1 µm de diamètre. Sous microscope, les cellules apparaissent groupées en grappe de raisin. Cela est dû à trois divisions planes et incomplètes. Ces cellules sont immobiles et donnent une couleur jaune-dorée à la colonie dont elles appartiennent. La paroi cellulaire contient trois constituants majeurs :

- le peptidoglycane, composé d'unités répétitives de N-acétyl-Glucosamine (β -1-4) liées à l'acide N-acétyl-muramique ;
- des acides teichoïques au ribitol, liés via des N-acétyl-manosaminyll (β -1-4) N-acétyl-Glucosamine au muramyl-6-phosphate ;
- la protéine A, liée au peptidoglycane par des liaisons covalentes (BHUNIA, 2008) .

L'espèce *Staphylococcus aureus* est aéro-anaérobie facultatif mais croit mieux en aérobiose. Elle est halotolérante (supporte 10-15% de NaCl), catalase positive (excepté pour *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*) et oxydase négative (VERNOZY-ROZAND, 1997 ; BHUNIA, 2008). C'est une espèce mésophile dont la température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C, la température minimale entre 5 et 10°C et maximale jusqu'à 45°C. Elle supporte des valeurs de pH comprises entre 4.2 et 9.3 avec un pH optimal de 7 à 7.5. (SATURA, 1998 in KERMMANE, 2009)

D'après VADAMODE *et al.* (1981) cette espèce croit dans des conditions d'activité de l'eau assez faible $A_w = 0.84$ et est capable de produire ses entérotoxines à une $A_w = 0.86$.

1.4.3.2. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus est une espèce pathogène car elle est capable de produire une ou des entérotoxines, protéines thermostables, responsables, après ingestion, de troubles digestifs chez l'homme. C'est pourquoi le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les aliments a été pratiqué depuis longtemps ; la bactérie est considérée comme bactérie potentiellement pathogène (POUMEYROL et LAFARGE, 1997). Cette bactérie est l'une des espèces bactériennes qui cause des mammites qui sont des réactions inflammatoires de la glande mammaire. Chez les principales espèces domestiques, elles se traduisent par des signes cliniques divers en fonction, entre autres, du stade d'évolution de ces réactions (aiguë, subaiguë, chronique) et de la nature des agents étiologiques impliqués dans leur apparition. Par ailleurs, ces mammites peuvent être aussi subcliniques. A l'instar d'autres espèces animales domestiques, les mammites ont été décrites chez les chamelles dans plusieurs pays (QUANDIL et OUDAR (1984) in KANE *et al.*, (2003a), BARBOUR *et al.*, (1985), ABDURAHMAN(1994)) in KANE *et al.*, (2003a), WERNERY et KAADEN (1995), OBIED *et al.*, (1996), AL- ANI *et al.*-SHAREEFI, (1997) in KANE *et al.*,(2003a), TIBARY et ANOUASSI (1997) in KANE *et al.*, (2003a), SGHIRI *et al.*, (2000) in KANE *et al.*,(2003a), KANE *et al.*, (2003b)). Cependant, les mammites semblent moins fréquentes chez les chamelles que chez les autres ruminants (vache, brebis, chèvre). En outre, les mammites subcliniques chez la chamelle sont plus fréquentes que celles avec des signes cliniques évidents.

II. Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Lait de chamelle

Les échantillons de lait utilisés, proviennent de chameelles vivant en extensif dans la région de Ouargla. Ces chameelles appartiennent à la population Sahraoui. Nous avons utilisé dans cette étude quatre échantillons de laits, de mélange (Tableaux II):

Tableau II : Échantillons de lait utilisés

Échantillons	Date de réception
1	20.01.2011
2	23.01.2011
3	02.02.2011
4	14.02.2011

Les échantillons de lait sont transportés au laboratoire de microbiologie dans des flacons propres. Une fraction est soumise à des tests préliminaires consistant en la mesure du pH, de la densité et de l'acidité titrable. Une autre fraction est immédiatement réfrigérée à 4°C en vue de subir d'autres analyses.

2.1.2. Lait de vache

Deux échantillons de lait bovin ont été transportés dans des flacons propres, au laboratoire de microbiologie. Le premier échantillon provient de la région de Ouargla, le deuxième de la région de EL-Oued. Les deux échantillons sont reçus le 08.02.2011 et subissent les mêmes tests préliminaires que les échantillons de lait camelin. Une fraction est stockée à 4°C pour des analyses ultérieures.

2.2. Méthodes

2.2.1. Tests physico-chimiques

Les échantillons de laits, camelin et bovin, subissent les mêmes tests physico-chimiques consistant en la détermination du pH, de l'acidité titrable et de la densité.

2.2.1.1. pH

La mesure du pH est réalisée par pH-métrie (Inolab MLM). L'électrode de référence pour la mesure de la concentration en ions H⁺ (donc du pH) est l'électrode à l'hydrogène. Celle-ci en platine, spécialement traitée, est immergée dans la solution dont le pH doit être mesuré (LEHNINGER, 1981).

2.2.1.2. Acidité Dornic

L'acidité du lait, exprimée en **degré Dornic**, est le nombre de ml d'hydroxyde de sodium 0.11 N nécessaire pour neutraliser 10 ml de lait en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré (1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait (FARAH *et al.*, 2004) (Annexe 2). L'acidité Dornic témoigne de l'état de fraîcheur du lait et de sa richesse relative en caséines, en phosphates, en citrate, enhydrogéo-carbonate et en lactates (SIBOUKEUR, 2007).

2.2.1.3. Densité

La mesure de densité est réalisée à l'aide de densimètres (Widoer, Germany).

2.2.2. Analyse microbiologiques

Les échantillons de laits, camelin et bovin, subissent les mêmes analyses et tests microbiologiques (fig. 3).

2.2.2.1. Test de la réductase

Le test de la réductase permet d'estimer la charge microbienne des échantillons de lait collectés. Son principe est basé sur la décoloration du bleu de méthylène. La rapidité de cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents (LARPENT *et al.*, 1997). Plus l'activité microbienne est forte, plus courte sera la durée de décoloration des échantillons (RYFFEL, 2006) (Annexe 3).

2.2.2.2. Choix de la souche cible

Dans le présent travail, nous avons choisi *Staphylococcus aureus* comme souche cible pour plusieurs raisons :

- elle est sensible aux bactériocines (CHOI, 2000 ; ALLOUCHE *et al.*, 2010) notamment à la nisine (RAIMBIAULT, 1995 ; SHARMA *et al.*, 2010) ;
- Cette espèce appartient à la flore de contamination pathogène des produits alimentaires (TRIAS, 2008). C'est une espèce que l'on peut retrouver dans le lait, mammiteux (LARPENT *et al.*, 1997) ;
- elle est résistante aux antibiotiques (RAHAL, 1984) ;
- elle est catalase positive. Cette propriété permet d'éliminer l'effet inhibiteur du H₂O₂ dans les tests d'antagonisme et dans les cultures mixtes ;
- c'est une espèce pathogène, responsable de nombreuses affections chez l'homme et chez l'animal
- cette souche est exigeante d'un milieu sélectif ;
- sa culture est facile en milieu hypersalé de Chapman.

2.2.3. Culture de la souche productrice de nisine et de la souche cible dans des milieux spécifiques (M17 / Chapman)

2.2.3.1. Préparation des dilutions

Les dilutions des échantillons de laits camelin et bovins sont préparées avec le même diluant.

2.2.3.2. Diluant

Nous avons utilisé un diluant adapté pour les bactéries aérobies mésophiles. Il est composé de :

- 1g de peptone pancréatique de caséine ;
- 8.5g de chlorure de sodium ;
- 1000 ml d'eau distillée (LARPENT *et al.*, 1997).

On peut également utiliser le milieu Ringer au ¼ ou le bouillon tryptone sel (GUIRAUD, 1998). Nous avons préparé des dilutions de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ (Annexe 4).

2.2.3.3. Ensemencement

La souche productrice de nisine et la souche cible ? isolées et purifiées à partir des laits, camelin et bovin, subissent les mêmes techniques d'ensemencement. Selon LARPENT *et al.*, (1997) ; NISSEN *et al.*, (1992), la culture de la souche productrice peut se réaliser sur milieux Elliker, Chalmers, M17 ou Mac Kay à 30°C. Dans ce travail, nous allons utiliser le milieu M17 pour la culture de la souche productrice de nisine (KELLY *et al.*, 1998; KERAMANE, 2009) (Annexe 5) et le milieu Chapman pour celle de la souche cible (GUIRAUD, 1998) (Annexe 6).

Puisque la majorité des bactéries lactiques, notamment le genre *Lactococcus* sont aérotolérantes (DELLAGLIO, 1994), nous avons effectué l'ensemencement en surface, le but étant l'identification, l'isolement et la purification de la souche et non le dénombrement.

Pour les staphylocoques nous avons également procédé à l'ensemencement en surface car ils sont anaérobies facultatifs (KLUYTMANS, 1997).

Nous avons, à cet effet, procédé à l'ensemencement de 0.1 ml environ (l'inoculation se fait à l'aide d'une pipette graduée stérile) de chaque dilution à la surface du milieu de culture après solidification de ce dernier. L'inoculum est étalé sur l'ensemble de la surface de la boîte de pétri à l'aide d'un râtelier. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 2 à 3 jours pour les lactocoques et à 37°C pendant 24 heures pour les staphylocoques (fig.4) (TERROINE, 1966; LARPENT *et al.*, 1997; MADIGAN *et al.*, 2007).

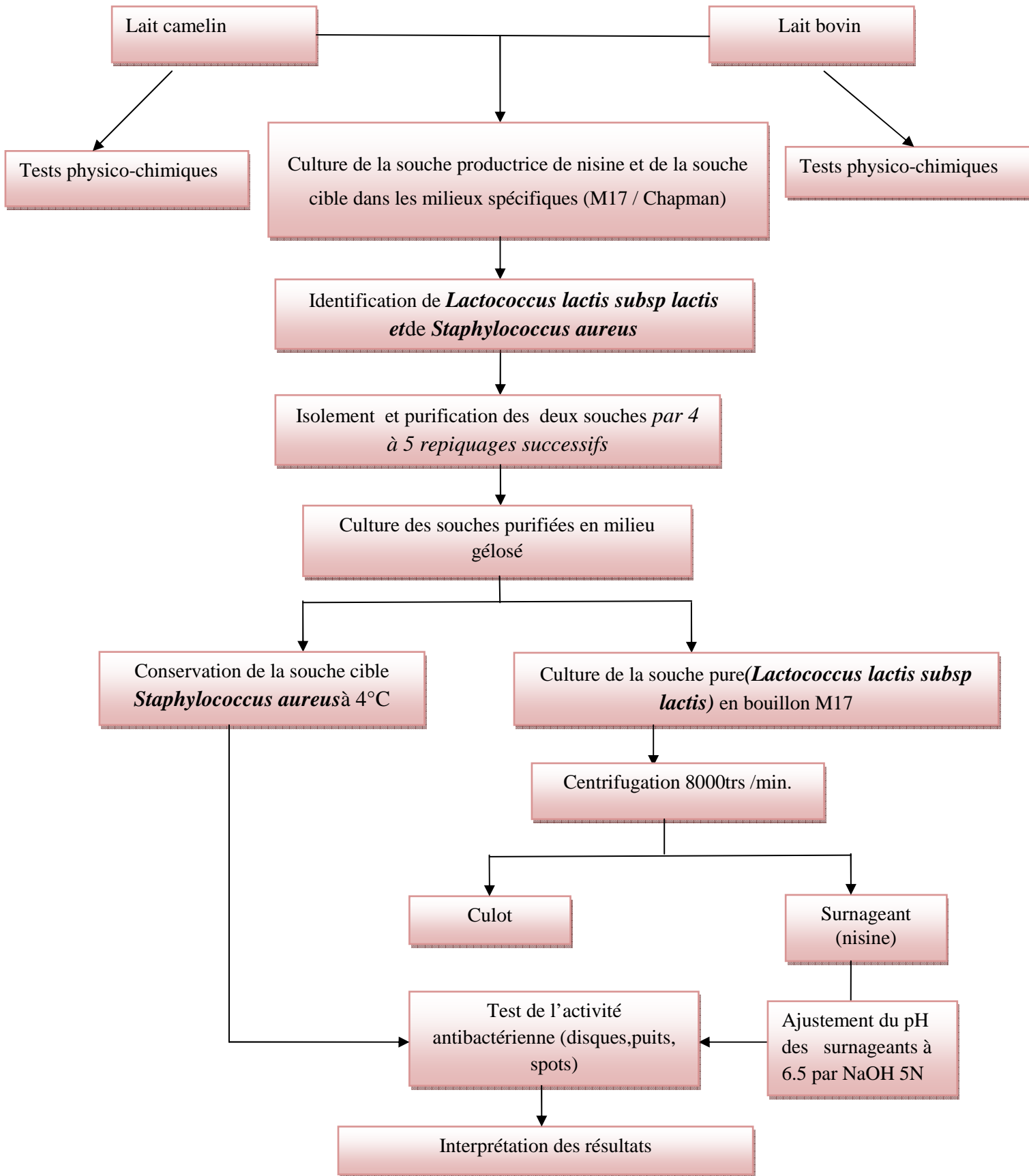


Figure 3 : Procédure expérimentale

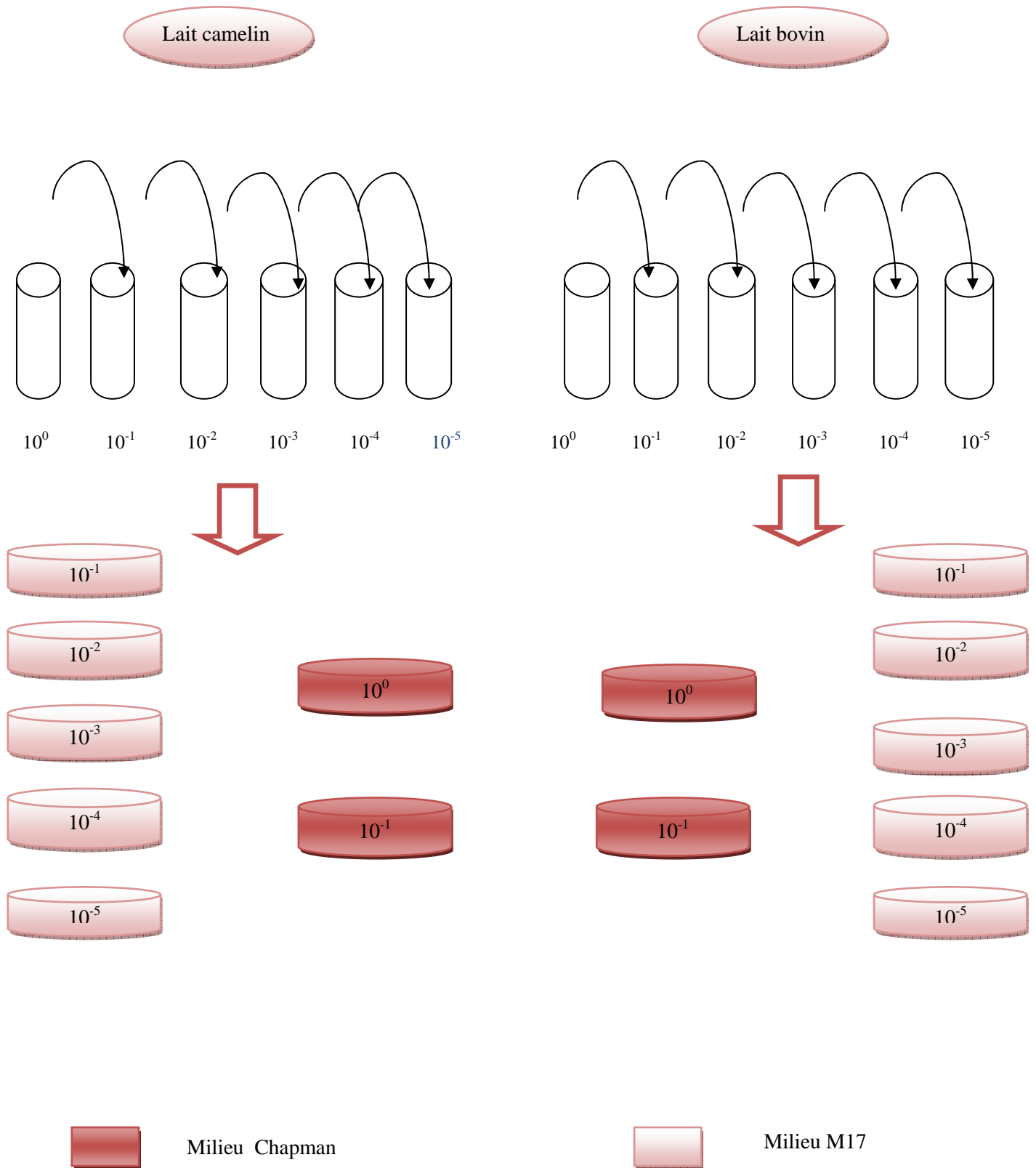


Figure4 : Culture de la souche productrice de nisine et de la souche cible dans milieux spécifiques (M17 / Chapman)

2.2.3.4. Identification des souches de *Lactococcus lactis subsplactis* et des souches de *Staphylococcus aureus*

2.2.3.4.1. Observations macroscopiques

Les observations macroscopiques, la coloration de GRAM et le test de catalase sont effectuées pour la souche cible et pour la souche productrice, isolées à partir des échantillons de laits des deux espèces, cameline et bovine.

2.2.3.4.1.1. Description des colonies

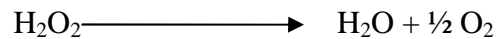
L'examen macroscopique des cultures est le premier effectué après isolement de la souche (BENT MOHAMED et SIDI BABAT, 2007). Il porte sur la description de :

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

2.2.3.4.1.2. Test de la catalase

La catalase catalyse la réaction de dégradation de l'eau oxygénée. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est

réparti: un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (GUIRAUD ,1998):



2.2.3.4.2.Observations microscopiques

Les observations microscopiques effectuées, à l'aide d'un microscope optique avec un objectif 100 à immersion (Bentlylaboscop 200), permettent d'examiner des prélèvements de colonies à l'état frais et après coloration de GRAM.

2.2.3.4.2.1.Coloration de GRAM

La coloration de GRAM est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries, non seulement d'après leur forme mais aussi d'après leur affinité pour les colorants, liée à la structure générale de la paroi (MARCHAL *et al.* ,1982) (Annexe 7).

2.2.3.4.3.Identification physicochimique et biochimique des *Lactococcus lactis subsplactis*

Les souches isolées subissent des tests d'identification physico-chimiques et biochimiques indiqués dans le tableau III.

2.2.3.5. Purification des *Lactococcus lactis subsplactis*

On prélève la colonie de *Lactococcus* identifiée macroscopiquement, biochimiquement, par le test de la catalase et par la coloration de GRAM et on réalise 4 à 5 repiquages successifs sur milieu M17. L'ensemencement est effectué en boîte de pétri en double exemplaires (SOBLEV et MACARENKO, 1977).

2.2.3.6. Purification des *Staphylococcus aureus*

La purification des *Staphylococcus aureus* est réalisée de la même manière que celle des *Lactococcus lactis subsp lactis*, mais en utilisant le milieu Chapman.

Tableau III : Tests d'identification physico-chimiques et biochimiques des souches, après leur isolement

Tests	Mode opératoire	Réaction positive
Type fermentaire	Du bouillon M17 est ensemencé en présence d'une cloche de Durham, et incubé à 30°C pendant 24h	Apparition de bulles de gaz dans la cloche de Durham
Croissance à différentes température	Le lait écrémé ensemencé est incubé à 10 °C pendant 1-7 jours, à 40°C pendant 24 h et à 45°C pendant 24h	Coagulation du lait
Tolérance à la salinité	Du bouillon M17 à des concentrations de 2%, 4% et 6.5% DE NaCl est ensemencé et incubé à 30°C pendant 24 h	Trouble du bouillon
Tolérance au pH alcalin	Du bouillon M17 alcalinisé à pH 9.6 et 9.2 est ensemencé et incubé à 30°C pendant 24h	Trouble du bouillon
Culture sur lait au bleu de Scherham	9 ml du lait additionné de 1 ml de bleu de méthylène à 1% sont ensemencés et incubés à 30°C pendant 24 h	Décoloration du bleu de méthylène qui se traduit par sa réduction
Hydrolyse de l'arginine	galeries API20	Le virage de couleur indique l'hydrolyse de l'Arg
Fermentation des Glccides	galeries API20	Le virage de couleur indique la fermentation du sucre

2.2.4.Optimisation des conditions de culture

Selon HENG *et al.*, (2007), dans les conditions de laboratoire où la bactérie est cultivée en monoculture (sans compétition), sans conditions de stress et dans de bonnes conditions nutritionnelles, la production de bactériocines peut facilement être épargnée. Un stress nutritionnel et/ou environnemental peut par contre, augmenter la production de bactériocines.

C'est pour cette raison que, nous nous sommes proposé de stresser la souche productrice (*L.lactis*) par une culture mixte avec la souche de *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, la supplémentation du milieu de culture avec du Glucose, du magnésium, une peptone, et un extrait de levure permet d'améliorer la production de bactériocines (HENG *et al.*, 2007). Puisque le milieu M17 contient trois types de peptone, de l'extrait de levure et du sulfate de magnésium (Annexe 5), nous lui avons rajouté du Glucose seulement (HENG *et al.*, 2007 ; SHARMA *et al.* 2010).

Un autre facteur peut influencer la production de bactériocines. En effet, SHARMA *et al.*, (2010), rapportent qu'une croissance maximale de *Lactococcus lactis subsp lactis* est observée après 24 heures d'incubation et à 35°C. La production de bactériocines étant dépendante physiologiquement de la croissance (De VUYST et LEROY, 2007), deux températures d'incubation sont utilisées dans la présente étude : 18 heures (habituellement utilisées) et 24 heures.

2.2.4.1. Propagation de la souche

Afin de préparer une culture mère, destinée à la production de bactériocine (nisine), il est indispensable de procéder à la « propagation de la souche » par la réalisation d'une préculture. Celle-ci est effectuée selon un protocole rapporté par DOUMANDJI *et al.* (2010) (fig.5).

La propagation de la souche consiste àensemencer une colonie de *Lactococcus lactis* préalablement purifiée (inoculum) dans 1 ml de bouillon M17 puis à incuber à 30°C pendant 24h : on obtient la « culture intermédiaire 1 ». On a utilisé deux tubes pour chacune des souches, cameline et bovine.

Après incubation, on procède à un deuxième repiquage dont lequel on repique 1 ml de la culture précédente dans un tube contenant 9 ml de milieu M17 : on obtient une deuxième culture : « culture intermédiaire 2 ».

2.2.4.2. Culture de l'espèce productrice de nisine

On ensemence un erlenmeyer de 250 ml contenant du bouillon M17, avec la culture précédente à raison de 10%. L'incubation est effectuée à 30°C. On obtient la culture de la souche productrice de nisine (DOUMANDJI *et al.* 2010).

2.2.4.3. Constitution des lots expérimentaux

Afin d'améliorer la production de nisine, nous avons constitué des lots expérimentaux en provoquant le stress de la souche par une culture mixte et /ou en supplémentant le milieu

de culture avec du Glucose (à raison de 1%). Le facteur durée d'incubation a également été pris en ligne de compte. Ainsi 8 lots de culture, numérotés de 1 à 8 ont été préparés (tableau IV). Chaque lot est divisé en deux fractions. L'une des fractions est incubée pendant 18 heures et l'autre pendant 24 heures : c'est respectivement les 2 sous-lots (a et b) (tableau IV).

2.2.5. Isolement de la nisine

Après incubation pendant 24 heures ou 18 heures, les lots expérimentaux de culture des souches subissent une centrifugation à 8000 trs/min (Universal 16 R), pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant les cellules est alors séparé du surnageant susceptible de contenir la bactériocine recherchée (nisine) (DIOP *et al.* 2007 ; TODOROV *et al.*, 2009). Nous obtenons finalement 4 lots expérimentaux de surnageants camelins dénommés lot1, lot2, lot3 et lot4 et 4 lots de surnageants bovins dénommés lot5, lot6, lot7 et lot8. Chaque lot est constitué de deux sous-lots a et b selon la température de l'incubation de la culture. Ainsi nous obtenons 16 sous lots de surnageants (tableau V)

2.2.6. Étude de l'activité antimicrobienne de la bactériocine à partir de surnageant

Le surnageant est neutralisé jusqu'au pH 6.5 avec NaOH 5N stérilisée, afin de lever l'activité antibactérienne des acides exercée par les acides organiques (NYKÄNEN *et al.*, 2000).

Trois méthodes sont utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne. Il s'agit des tests, des puits, des spots et des disques.

2.2.6.1. Test des puits

Des boîtes de Pétri contenant le milieu Chapman sont ensemencées par inondation avec la souche cible (*Staphylococcus aureus*). Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement dans la gélose de chaque boîte. On remplit les puits avec 50 µl du surnageant neutralisé, et on place les boîtes à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne (METLEF et DILMI-BOURAS, 2009; DOUMANDJI *et al.*, 2010; ALLOUCHE *et al.*, 2010). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des puits (DOUMANDJI *et al.*, 2010).

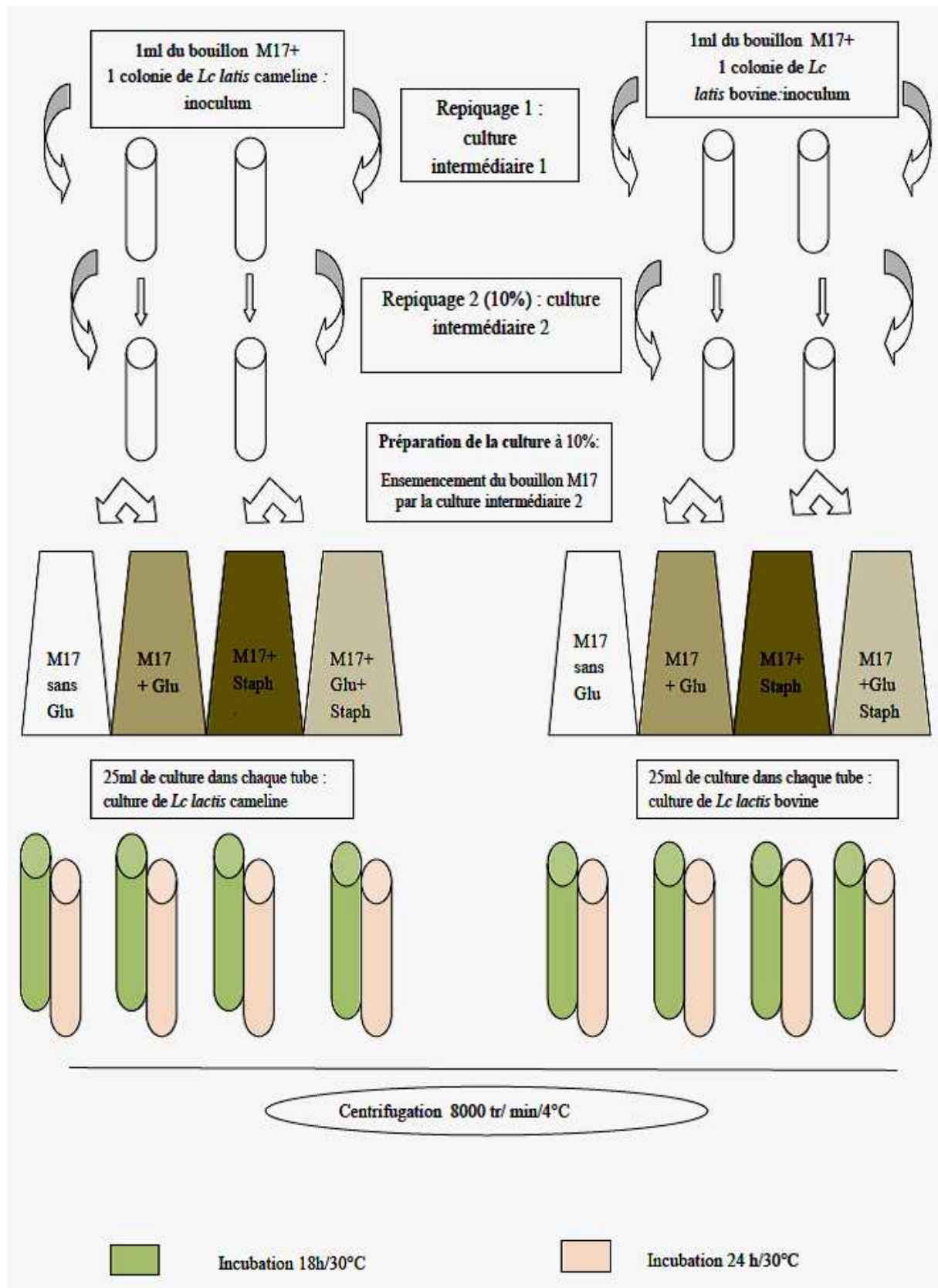


Figure5: Procédure de culture des souches en vue de la production de nisine

Tableau IV : Constitution des lots expérimentaux de culture de souche productrice de nisine

Lot N°	Sous lot	Glucose	culture	Durée d'incubation
1	a	-	pure	18 h
	b	-	pure	24 h
2	a	+	pure	18 h
	b	+	pure	24 h
3	a	-	mixte	18 h
	b	-	mixte	24 h
4	a	+	mixte	18 h
	b	+	mixte	24 h
5	a	-	pure	18 h
	b	-	pure	24 h
6	a	+	pure	18 h
	b	+	pure	24 h
7	a	-	mixte	18 h
	b	-	mixte	24 h
8	a	+	mixte	18 h
	b	+	mixte	24 h

a : incubation pendant 18h, **b** : incubation pendant 24 h

Tableau V : Lots expérimentaux de surnageants

espèce	cameline								bovine							
lot	lot 1		lot 2		lot 3		lot 4		lot 5		lot 6		lot 7		lot 8	
Sous lot	Sous lot1a	Sous lot1b	Sous lot2a	Sous lot2b	Sous lot3a	Sous lot 3b	Sous lot4a	Sous lot4a	Sous lot5a	Sous lot5b	Sous lot6a	Sous lot6b	Sous lot7a	Sous lot7b	Sous lot8a	Sous lot8b

2.2.6.2. Test par la méthode des disques (diffusion en milieu gélosé)

La technique des disques consiste à utiliser des disques (de 5mm de diamètre) en papier filtre préalablement stérilisés, imprégnés du surnageant à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose Chapman uniformémentensemencée avec une suspension

de la bactérie cible déjà isolée (*Staphylococcus aureus*)(GUIRAUD ,1998). Les boîtes sont placées à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne(METLEF et DILMI-BOURAS, 2009 ; DOUMANDJI *et al.* ,2010 ALLOUCHE*et al.*2010).On incube à 37°C pendant 24 h

La souche *Staphylococcus aureus* diffuse au sein de la gélose, sauf là où elle rencontre une concentration de bactériocine suffisante pour inhiber sa croissance. On observe alors autour des disques, une zone circulaire indemne de colonies bactériennes, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible à la bactériocine, plus il est petit, plus la souche est résistante. Donc la souche est classée sensible, intermédiaire ou résistante (XIA *et al.* ,2005).

2.2.6.3. Test des spots

Après avoir coulé les boîtes de pétri avec de la gélose PCA (solidifiées et séchées) on dépose 5µl de surnageant en spots .Les boîtes sont séchées à l'air ambiant près du bec bunsen pendant environ 30 minutes. La gélose est recouverte d'une gélose semi molle du milieu PCAensemencée avec la souche cible(*Staphylococcus aureus*).Les boîtes sont incubées 24 heures à 37 °C (SCHILLINGER et LUCKE, 1989)



*III. Résultats et
discussion*

III. Résultats et discussion

3.1.Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin

Les propriétés physicochimiques du lait camelin, à savoir la densité, l'acidité titrable et le pH ont été déterminés parallèlement à celles du lait bovin, dans un but comparatif (fig. 6).

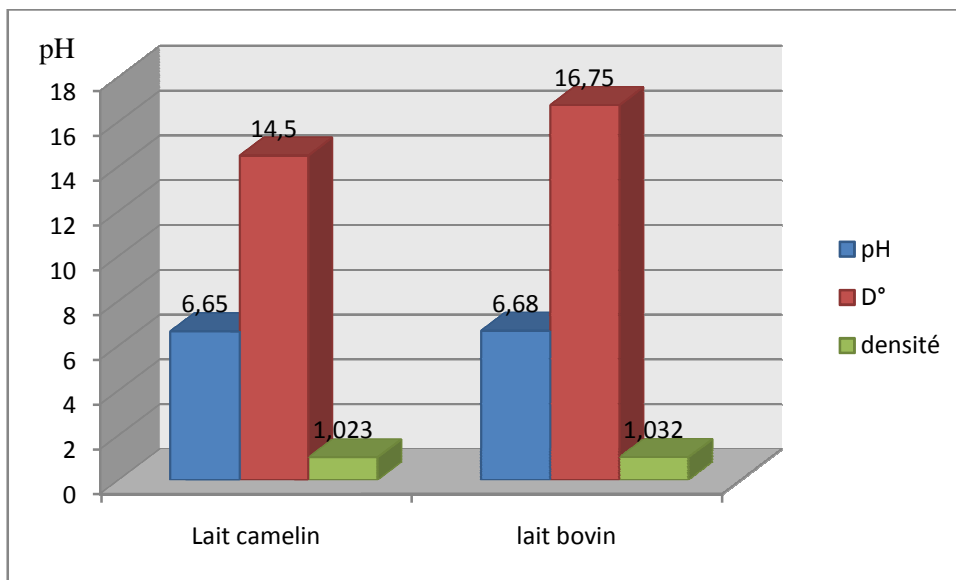


Figure 6: Principales caractéristiques physico chimiques du lait camelin, en comparaison avec le lait bovin

3.1.1.pH

Les résultats relatifs au pH des échantillons de lait camelin sont regroupés dans le tableau III.

Globalement, le pH des échantillons de lait camelin égale à 6.65 ± 0.25 est comparable à celui des deux échantillons de lait bovin égale à 6.68 en moyenne. Les valeurs du pH que nous avons enregistrés lors de la présente étude se situent dans la fourchette des valeurs rapportées par les auteurs ayant travaillé sur le lait chamelle. En effet, HASSAN (1987) in SIBOUKEUR (2007) signale des pH de l'ordre de 6.6 à 6.97, KAMOUN (1995) des pH de l'ordre de 6.51 ± 0.12 , ABU TARBOUCH *et al.*, (1998) des pH de l'ordre de (6.49 ± 0.024) , SMAIL (2002), (6.24 ± 0.48) SIBOUKEUR (2007) des pH de l'ordre de (6.31 ± 0.15) , enfin, MAHBOUB (2010) des pH de l'ordre de (6.65 ± 0.132) . Cette acidité pourrait être expliquée par une grande richesse en vitamine C qui est de l'ordre de 50 mg/l (YAGIL *et al.*, 1994; EL KHASMI *et al.*, 2005 ; MAL et PATHAK, 2010). La valeur

du pH est dépendante de la teneur en citrates et en caséines ainsi de l'état sanitaire de la mamelle (MATHIEU, 1998 in SIBOUKEUR, 2007). D'après YAGIL *et al.*, (1998) ; GORBEN et IZZELDIN, (1997) in SIBOUKEUR, (2007), le pH pourrait être affecté par l'alimentation et la disponibilité de l'eau.

Tableau VI : Mesure du pH des échantillons de lait camelin analysés

N° de l'échantillon	Date de collecte	pH
1	20.01.2011	6.52
2	23.01.2011	6.54
3	02.02.2011	7.03
4	14.02.2011	6.51
Moyenne		6.65 ± 0.25

3.1.2. Acidité Dornic

La valeur de l'acidité titrable des échantillons de lait camelin et bovin sont mentionnés dans les tableaux, IV et V. Le lait bovin présente une acidité Dornic plus élevée que celle dans le lait camelin. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par SAWAYA *et al.*, (1989) ; MEHAIA, (1993) et qui sont égales à 14°D. Ils sont toutefois, différents de ceux obtenus par SBOUI *et al.*, (2009) en Tunisie soit (17,2 °D±1.03) pour le lait camelin et 17.12°D±0.64 pour le lait bovin. Ils sont également différents des résultats obtenus par SIBOUKEUR (2007) soit 18.2°D ±2.93 pour le lait camelin.

Le lait camelin se caractérise par un effet tampon plus prononcé par rapport au lait bovin. Cela permet d'expliquer pourquoi l'acidité de ce lait est plus faible que celle du lait bovin bien que leurs pH soient comparables (ABU- TARBUSCH (1996) ; SIBOUKEUR 2007).

Tableau VII: Mesure de l'acidité Dornic des échantillons du lait camelin

N° de l'échantillon à partir du lait camelin	Acidité Dornic (°D)
1	15
2	16
3	12
4	15
Moyenne	14.5 ± 1.3720

Tableau VIII: Mesure de l'acidité Dornic des échantillons du lait bovin

N° de l'échantillon à partir du lait bovin	Acidité Dornic (°D)
1	15.5
2	18
Moyenne	16.75

3.1.3.Densité

Les résultats de la mesure de la densité des échantillons des laits camelin et bovin sont mentionnés dans les tableaux IX et X:

Tableau IX : Mesure de la densité des échantillons du lait camelin

N° de l'échantillon de lait camelin	Densité
1	1.020
2	1.025
3	1.020
4	1.030
Moyenne	1.023 ± 0.0047

La densité des échantillons de lait camelin est égale à 1.023 ± 0.0047 , alors que celle du lait bovin est égale à 1.032. Elle est comparable à celles rapportées par

KAMOUN (1995), ABIDI, (2001), SIBOUKEUR, (2007) et MAHBOUB, (2010) soit respectivement 1.028 ± 0.002 , 1.020 ± 0.004 , 1.023 ± 0.0045 et 1.027 ± 0.006 .

La densité dépend directement de la teneur en matière sèche qui est liée fortement à la fréquence de l'abreuvement (SIBOUKEUR, 2007). Ce qui explique la variabilité des valeurs entre les différents échantillons de laits et entre celles citées dans la littérature.

Tableau X : Densité des échantillons de lait bovin

N° de l'échantillon à partir du lait bovin	Densité
1	1.030
2	1.035
Moyenne	1.032

La densité des échantillons de lait de vache égale à 1.032 en moyenne est plus élevée que celle du lait de chamelle. Ces constatations ont été évoquées par de nombreux auteurs (RAMET, 2003 ; FILIPOVITCH, 1954). En effet, la densité relativement faible du lait camelin représente l'une des caractéristiques et pose un problème pour sa transformation en fromage.

3.2. Analyses microbiologiques

3.2.1. Test de la réductase

La décoloration de bleu de méthylène a commencé au delà de 5 heures. Cela signifie que les échantillons de lait de chamelle testés présentent une bonne qualité hygiénique (LARPENT *et al.*, 1997). Le taux de germes dans ce lait peut être estimé entre 10^5 à 2.10^5 germes/ml (LARPENT *et al.*, 1997). KAMOUN (1990) ; YAGIL *et al.*, (1994) et d'autres auteurs s'accordent sur le fait que la qualité bactériologique du lait camelin peut être irréprochable si la traite est effectuée dans les conditions hygiéniques requises.

3.2.2. Identification de la souche isolée sur M17

L'identification de la souche isolée à partir des laits de chacune des deux espèces, cultivée sur milieu M17, est basée sur des observations macroscopiques, microscopiques, sur des tests physico-chimiques et biochimiques.

3.2.2.1.Observations macroscopiques

La description des colonies formées après incubation de lait à 30°C pendant 48 à 72 heures, est indispensable pour l'identification des souches.

3.2.2.1.1.Description des colonies

*Lait camelin

Nous avons tenu compte de l'échantillon de lait et de la dilution qui a permis l'obtention de colonies isolées et dont le nombre est entre 30 et 300 (MADIGAN *et al.*,2007). La dilution 10^{-5} de l'échantillon n° 1 a été retenue pour la suite de ce travail(photo1).

Ainsi, deux types de colonies qui ne diffèrent que par leur taille, se sont développées. La première présente un diamètre de 2 mm environ alors que la seconde est beaucoup plus petite(0.5 à 1 mm).Selon DELLAGLIO *et al.*,(1994), la taille maximale d'une colonie de *Lactococcus lactis* peut varier de 10^{-1} mm à plusieurs millimètres.

Leur aspect est identique. Elles sont opaques de couleur jaune- crème. Elles présentent une texture(consistance) crémeuse. Leur surface est lisse et brillantes (Photo 1). Leur forme est ronde et bombée avec un contour régulier(tableau XI).

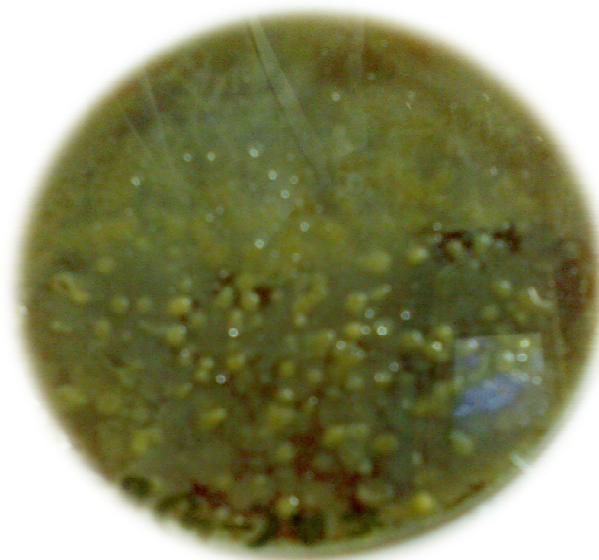


Photo 1 : Colonies développées sur milieu M17

Tableau XI:Description des colonies isolées à partir du lait camelin en milieu M17

	Colonie 1	Colonie 2
Taille	2 mm	0.5 à 1 mm
Forme	Ronde bombée avec un contour lisse	Ronde bombée avec un contour lisse
Couleur	Crème	Crème
Aspect de surface	Lisse et brillante	Lisse et brillante
Consistance	Crémeuse	Crémeuse
Opacité	Opaque	Opaque

***Lait bovin**

Deux types de colonies qui diffèrent seulement par leur taille, se sont développées. Ces colonies présentent les mêmes caractéristiques que celles des colonies isolées à partir du lait camelin, mais leur taille est plus petite. Toutefois, il est à noter que les colonies bovines sont relativement plus petites que les colonies camelines (0,5 à 1.5 mm versus 0,5 à 2 mm) (tableau XII).

Tableau XII:Description des colonies issues du lait bovin

	Colonie 1	Colonie 2
Taille	1.5 mm	0.5 mm
Forme	Ronde bombée avec un contour lisse	Ronde bombée avec un contour lisse
Couleur	Crème	Crème
Aspect de surface	Lisse et brillante	Lisse et brillante
Consistance	crémeuse	crémeuse
Opacité	opaque	opaque

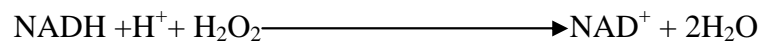
3.2.2.1.2. Test de la catalase

La recherche de cette enzyme constitue une étape importante de l'identification mais le test à l'eau oxygénée peut donner des résultats aléatoires puisque certaines bactéries lactiques possèdent des pseudo-catalases non hémiques (une Mn catalase) qui rendent la

réaction positive (effervescence) (DESMAZEAUD et DE ROISSART ,1994). Ceci semble être une explication au résultat que nous avons enregistré dans la présente étude puisque dans le cas des deux souches, cameline et bovine, une effervescence est observée. En effet, les bactéries lactiques dont le genre *Lactococcus* sont les seules bactéries à GRAM + aérotolérantes à ne pas posséder de système respiratoire (ni cytochrome, ni catalase) (DESMAZEAUD et DE ROISSART ,1994).

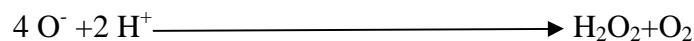
Par ailleurs, il faut signaler que la plupart des bactéries lactiques possèdent leurs propres moyens de défense contre la toxicité de l'oxygène (DESMAZEAUD et DE ROISSART ,1994):

- elles produisent une peroxydase flavinique en utilisant du NADH₂ comme réducteur, selon la réaction :



Selon ANDERS *et al.*, (1970); SEELEY et VANDEMARK,(1951); GOTZ *et al.*,(1980); WALKER et KILGOUR,(1980) cités par DESMAZEAUD et DE ROISSART ,(1994), ce mécanisme est probablement le plus répandu chez les bactéries lactiques (lactocoque et entérocoque, lactobacilles mésophiles.

- elles synthétisent une superoxyde dismutase à Mn qui catalyse l'élimination des radicaux libres d'oxygène selon la réaction :



Cette enzyme réduit ainsi un peu la toxicité de l'oxygène (FRIDOVICH ,1979 in DESMAZEAUD et DE ROISSART,(1994) .On la rencontre chez des lactocoques et des entérocoques (BRITTON *et al.* (1978) in DESMAZEAUD et DE ROISSART,(1994).

- elles accumulent des ions Mn⁺² qui en s'oxydant font disparaître les radicaux libres d'oxygène.

Ces deux derniers phénomènes ont été observés chez *Lb. plantarum* (KONO et FRIDOVICH,(1983); ARCHIBALD et FRIDOVICH, (1981) in DESMAZEAUD et DE ROISSART (1994).

3.2.2.2. Observations microscopiques

3.2.2.2.1. Examen à l'état frais

Les deux souches isolées se présentent sous forme de coques immobiles.

3.2.2.2.Examen après coloration de GRAM

Après coloration de GRAM, une observation à l'immersion, au grossissement 1000, montre que les souches étudiées sont GRAM+ (en violet). Certaines sont isolées (monocoques), d'autres regroupées en diplocoques ou en chainettes (Photo2 et 3).

Les observations macroscopiques et microscopiques sont complétées par des tests physicochimiques et biochimiques.

3.2.2.3. Identification physicochimique et biochimique des souches isolées

Les résultats de l'identification biochimique des souches isolée à partir du lait camelin et bovin sont mentionnés dans le tableau XIII.

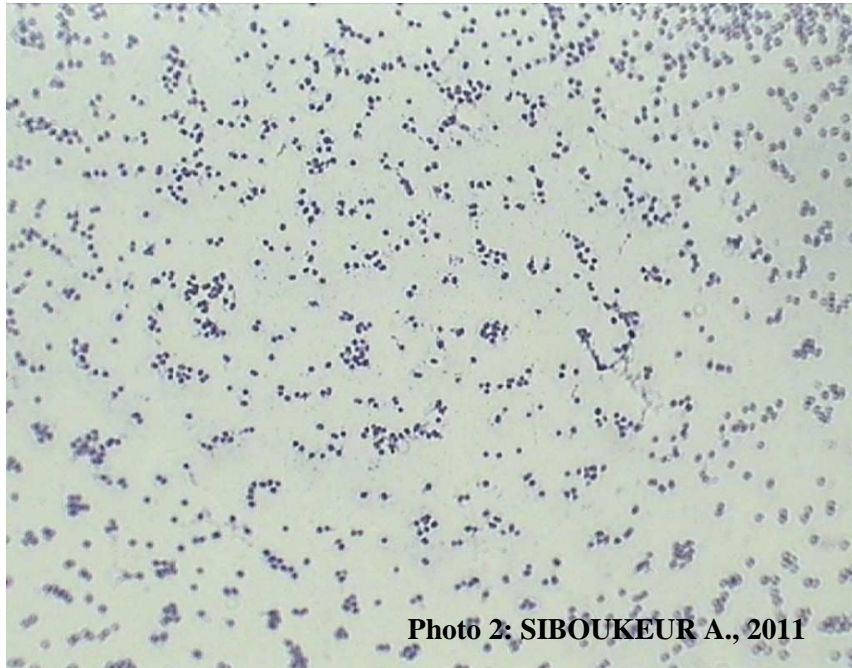


Photo 2: SIBOUKEUR A., 2011

Photo 2: Souche de lactocoque après coloration de GRAM (lait camelin). (Gx 100)

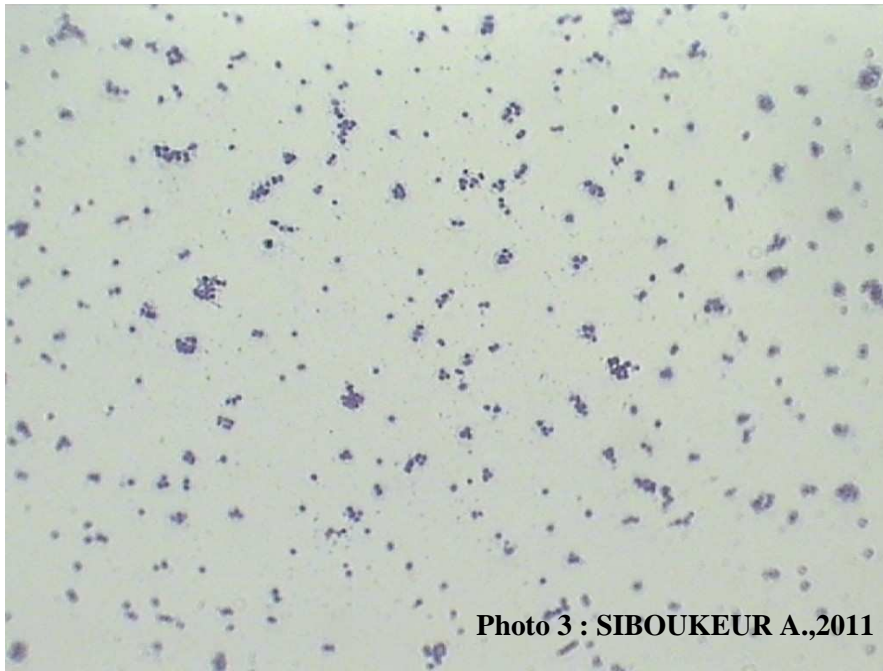


Photo 3 : SIBOUKEUR A.,2011

Photo 3:Souche de lactocoque après coloration de GRAM (lait bovin). (Gx 100)

Les photos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 représentent les résultats relatifs aux tests d'identification physico-chimiques des deux souches isolées.

On constate que les souches issues du lait de chamelle et celles issues du lait de vache présentent les mêmes propriétés physico-chimiques et biochimiques. Elles se comportent donc de la même manière. Ces résultats sont confortés par ceux relevés dans la bibliographie pour l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* (DELLAGLIO *et al.*, 1994)(Annexe 8).

Les souches isolées dans le présent travail sont de type homofermentaire (absence de production de CO₂ dans la cloche de Durham).

Elles ne croissent pas à des concentrations de 6,5 % en NaCl mais croissent à des concentrations comprises entre 2 et 4 %. Cette inaptitude constitue une des caractéristiques des *Lactococcus lactis*

Les deux souches ne présentent pas une croissance à pH 9.6 et présentent une croissance à pH 9.2. Ce caractère permet de distinguer l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* des espèces *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis diacetylactis* .

Elles sont capables de pousser à des températures comprises entre 10°C et 40°C et incapables de se multiplier à 45°C. En plus de cela, ces souches hydrolysent l'arginine. Elles

ne fermentent pas les sucres suivants : Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy et Ara. La culture de ces souches sur du lait au bleu de Scherham est positive (coagulation, décoloration et acidification). De tout ce qui précède et étant donné le milieu sélectif utilisé (M17), il semblerait qu'ils s'agissent dans le cas des deux souches isolées, de l'espèce *Lactococcus lactis*. Le test de croissance à pH 9.6 et l'incapacité de fermenter les sucres, sont de nature à confirmer qu'il s'agit de *Lactococcus lactis subsp lactis* car selon GUIRAUD,(1998), *Lactococcus lactis subsp lactis* est la seule souche de lactocoques par rapport à *Lactococcus lactis subsp cremoris et diacetylactis* qui ne se développe pas à pH 9.6.

Tableau XIII : Identification biochimique des souches isolées à partir du lait camelin et bovin

Tests	Souche cameline	Souche bovine
Type fermentaire	Absence de bulle de gaz dans la cloche	Absence de bulle de gaz dans la cloche
Croissance à 45°C	-	-
Croissance à 40°C	+	+
Croissance à 10°C	+	+
Tolérance à 2% de NaCl	+	+
Tolérance à 4% de NaCl	+	+
Tolérance à 6.5% de NaCl	-	-
Tolérance au pH 9.2	+	+
Tolérance au pH 9.6	-	-
Culture sur lait au bleu de Scherham	+	+
Hydrolyse de l'arginine	+	+
Utilisation du Cit	+	+
Fermentation de Man	-	-
Fermentation de Ino	-	-
Fermentation de Sor	-	-
Fermentation de Rha	-	-
Fermentation de Sac	-	-
Fermentation de Mel	-	-
Fermentation de Amy	-	-
Fermentation de Ara	-	-

3.2.3. Identification de l'espèce cible

Le milieu hypersalé de Chapman est un milieu sélectif, indiqué pour la flore halotolérante telle que l'espèce *Staphylococcus aureus* (LARPENT *et al.*, 1997).

Après des tentatives d'ensemencement de différentes dilutions issues du lait bovin et du lait camelin, une colonie s'est développée dans l'une des boîtes ensemencées avec le lait bovin (dilution 10^0). La colonie en question présente une taille de 4 mm, une couleur jaune dorée avec un halo jaune (photo 12). Elle est catalase +. Ces résultats concordent avec ceux de ABIDI (2002) et KERAMANE (2009) qui rapportent que les colonies de *Staphylococcus aureus* possèdent une taille de 4 mm.

Le jaunissement du milieu de culture (photo 12) est dû à la dégradation du mannitol par les staphylocoques, qui élaborent souvent leurs propres pigments dont la production s'accroît après la sortie des boîtes de pétri de l'étuve (MARCHAL *et al.*, 1982). Cette souche appartient à la flore de contamination et peut être issue d'une vache atteinte de mammite.

L'absence de développement de la flore halotolérante dans le cas du lait de chamelle est probablement dû au système protecteur de ce lait. Selon SIBOUKEUR *et al.* (2002), le taux des Staphylocoques dans le lait de chamelle diminue durant l'entreposage et finit par s'annuler. Par ailleurs, ce germe présente un pH optimal qui se situe entre 7 et 7.5 (SUTRA, 1998 in KERMANE, 2009 ; ELILLOT, 2001) ce qui n'est pas le cas du pH du lait camelin. Dans le même contexte, une étude menée à Nouakchott sur 221 chameelles (*Camelus dromedarius*) à différentes périodes de lactation à savoir 24% en début de lactation, 27% en milieu de lactation et 48% en fin de lactation, n'a pas pu détecter de signe clinique de mammite (KANE *et al.*, 2003). En outre la prévalence des mammites subcliniques chez les chameelles des troupeaux suivis, a été de 44.33%. Sept genres bactériens : *Streptococcus* (42%), *Staphylococcus* (17%), *Escherichia* (12%), *Micrococcus* (11%), *Pseudomonas* (8%), *Proteus* (8%) et *Enterobacter* (2%) ont été identifiés (KANE *et al.*, 2003).

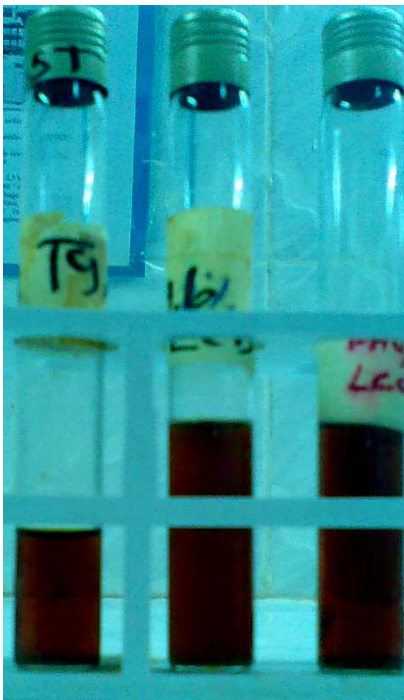


Photo 4: Croissance à pH 9.6



Photo 5: Type fermentaire



Photo 6: Croissance à pH 9.2

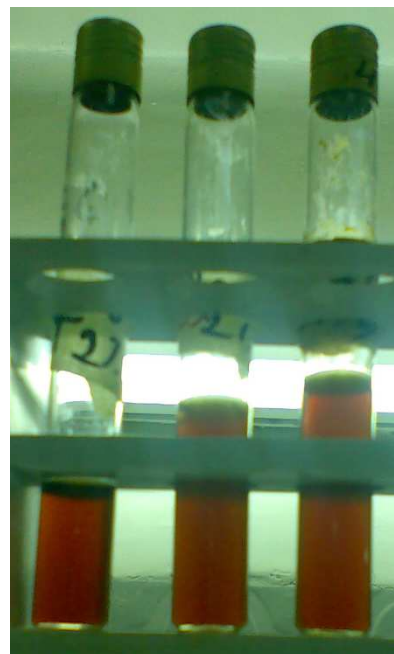


Photo 7: Croissance en présence de
2% de NaCl



Photo 8: Croissance en présence de 4% de NaCl



Photo 9: Croissance en présence de 6.5 % de NaCl



Photo 10: Culture sur lait au bleu de Scherham



Photo 11: Croissance à 40°C



Photo12 : SIBOUKEUR A.2011

Photo 12 :Colonies issues du lait bovinensemencé sur milieu Chapman

Après une coloration de GRAM, les cellules sont colorées en violet (Gram +) et elles sont regroupées en grappes de raisin (Photo 13). Ce type de regroupement est une des principale caractéristiques du genre *Staphylococcus* ; le préfixe « staphyle » désigne grappe de raisin(KLOOS ,1980 ; JIN *et al.*, 2004)

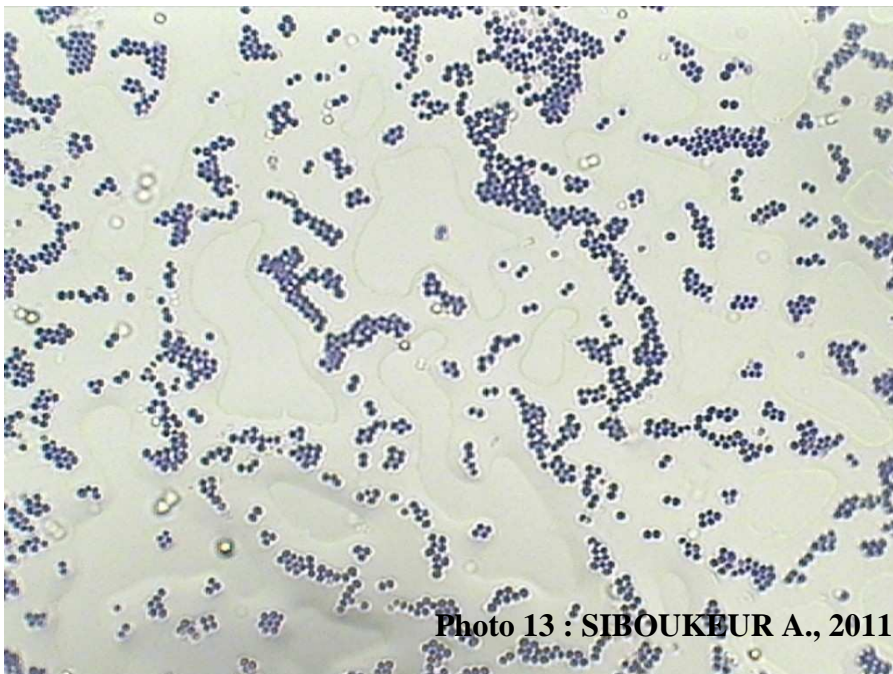


Photo 13 : SIBOUKEUR A., 2011

Photo 13 : Colonies de *Staphylococcus aureus* (G x 100)

3.2.4. Purification des souches

Après 4 à 5 repiquages successifs des souches préalablement isolées, nous avons obtenus des colonies pures de *Lactococcus lactis subsp lactis* issus des laits des deux espèces et des *Staphylococcus aureus* issus du lait bovin.

3.3.Optimisation des conditions de culture de la souche productrice

Cette étape est réalisée dans le but essentiel d'obtenir une production optimale de nisine (fig. 6). La production de bactériocines est dépendante physiologiquement de la croissance de la souche productrice (De VUYST et LEROY, 2007). Celle-ci est liée à l'activité métabolique de la souche, elle-même liée à la production d'acide lactique (BEAL *et al.*, 1994) et donc à la diminution du pH

3.3.1. Séparation de la biomasse

Après centrifugation à 8000 trs/min. à 4°C des cultures bactériennes et séparation de la biomasse, on récupère les différents lots de surnageants (tableau V). Ces derniers dénommés SNC et SNB, respectivement pour le surnageant de la culture de *Lactococcus lactis* camelin et celui de la culture de *Lactococcus lactis* bovin, subissent une mesure de pH (fig. 7 et 8).

3.3.1.1. Mesure du pH des surnageants

Le pH initialement égale à 7.2 (pH du milieu M17), diminue après ensemencement par les souches purifiées de lactocoques (pH des surnageants) (fig.7 et 8). Ceci est le résultat du métabolisme du lactose par la souche de *Lactococcus lactis* afin d'assurer sa croissance. La dégradation du lactose conduit à la formation de lactate responsable de l'abaissement du pH.

Le pH des SNC se situe entre pH 6,13 (s/lot 2a) et pH 6,37 (s/lot 3a). Celui des SNB plus élevé puisqu'il se situe entre pH 6,20 (s/lot 7b) et pH 6,69 (s/lot 8b), semble indiquer que le métabolisme des souches Lc camelin est relativement plus intense. Ce résultat est de nature à penser que les souches de Lc camelins présenteraient une activité métabolique plus importante que celles des Lc bovins.

3.3.1.1.1. Mesure du pH des surnageants de culture de *Lc* camelin en fonction de la durée d'incubation (SNCa et SNCb)

- **pH des SNCa**

Le s/lot2a des surnageants de la culture de *Lactococcus lactis* camelin incubée pendant 18 heures (SNCa) présente le pH le plus faible (pH 6,13) et le s/lot 3a le pH le plus élevé (pH 6.37).

En comparaison avec le témoin a (s/lot1a : sans add. de Glc et en culture pure), il semblerait que la supplémentation du milieu M17 avec du Glucose (s /lot 2a) permet une meilleure croissance de la souche alors que le stress provoqué par l'addition des staphylocoques, l'entrave (s/lot 3a).

Le s/ lot 4a représente un cas intermédiaire, avec un comportement similaire à celui du témoin 1a.

- **pH des SNCb**

Après 24 heures d'incubation l'activité métabolique des *Lc* est maximale (s /lot 1b) par rapport au témoin 1 a (s /lot 1a), puisque le pH est égale à 6,17. Cela peut être expliqué par l'augmentation de la croissance de la souche cultivé en milieu M17 non additionné de Glucose et en culture pure, avec le temps.

Le s/lot 4 b est caractérisé par un pH égale à 6 ,33 donc plus élevé par rapport au s/lot 1b (témoin 1b). Cela suppose que l'activité métabolique de la souche y est moins intense.

Les comportements des s/lot2b et s/lot3b se rapprochent entre eux et avec celui du témoin 1a. Donc l'addition de Glc et/ ou de staph. , semble ne pas avoir un effet certain sur la croissance de la souche productrice.

Il ressort de ce qui précède que :

- L'addition du Glc dans une culture de *Lc* incubé pendant 18 heures augmente sa croissance ;
- le prolongement de la durée d'incubation à 24 heures avec l'addition du Glucose n'a pas un effet sur la croissance de la souche ;
- le stress provoqué par l'addition des staph. (culture mixte avec les *Lc*) avec une incubation pendant 18 heures diminue la croissance de ces derniers ;

- le prolongement de la durée d'incubation à 24 heures d'une culture mixte n'a aucun effet sur la croissance des Lc ;

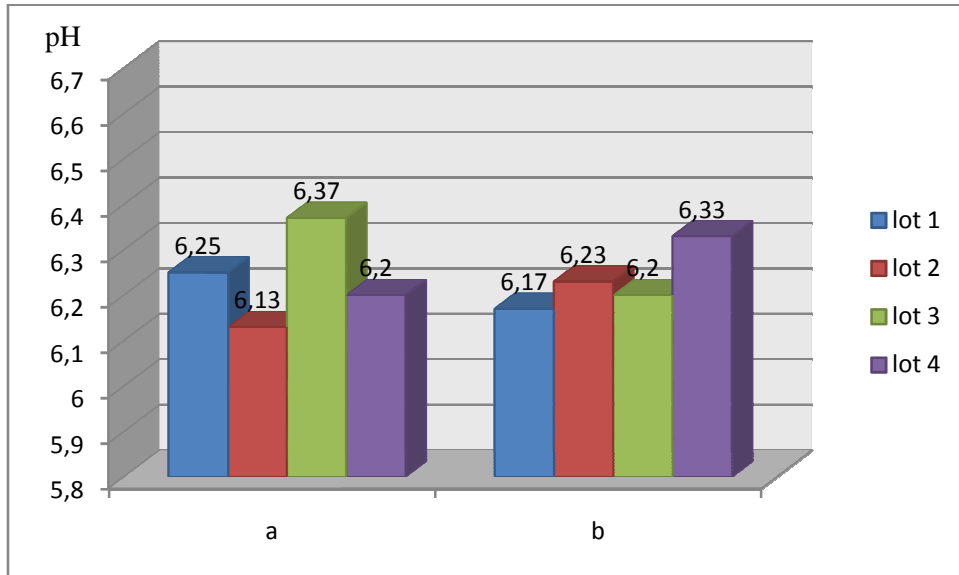


Figure 7: Valeurs du pH des lots de surnageant(SNC)

a: incubation pendant 18h **b:** incubation pendant 24h

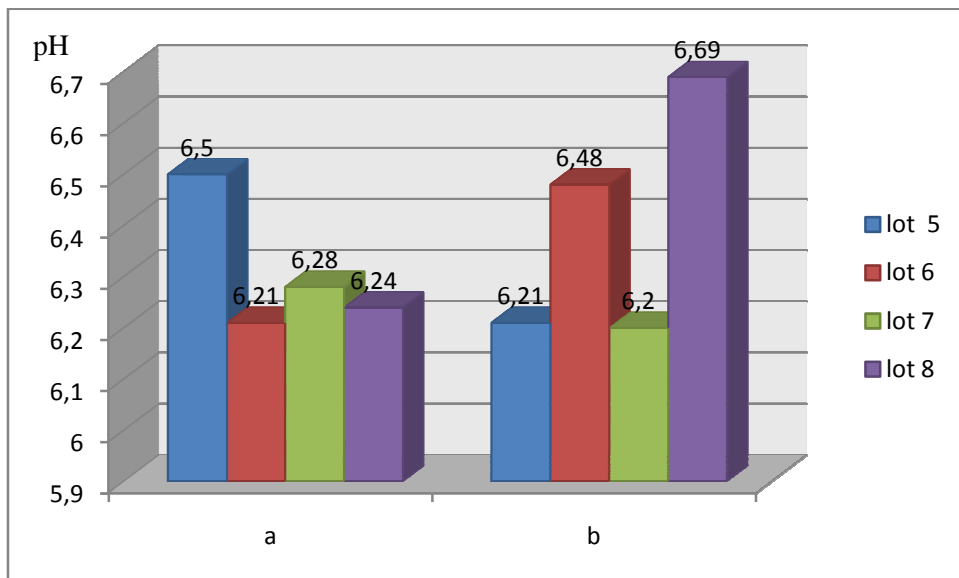


Figure 8 : Valeurs du pH des lots de surnageant(SNB)

a: incubation pendant 18h **b:** incubation pendant 24h

3.3.1.1.2. Mesure du pH des surnageants de culture de Lc bovin (SNBa et SNBb)

- **pH des SNBa**

Le s/lot 6a des surnageants de la culture de *Lactococcus lactis* bovin incubée pendant 18 heures (SNBa) présente le pH le plus faible (pH 6,21) et le s/lot 5a (témoin 5a), le pH relativement le plus élevé (pH 6,5). Donc l'addition du Glc semble améliorer la croissance des Lc bovins.

Les s/lot 7a, s/lot 8a présentent des pH comparables (pH 6,28 et 6,24 respectivement) au pH du s/lot 6a des SNBa qui est le plus faible (pH 6,21). Cela montre que l'addition du Glucose et/ou des staph. améliore la croissance des Lc.

- **pH des SNBb**

Le s/lot 7b présente un pH comparable à celui du témoin 5b (s/lot 5b). Ces valeurs étant les plus faibles (6,20 et 6,21 respectivement), dénotent une activité métabolique donc une croissance des Lc maximale. Comparativement au témoin 5a, les/lot 7b et s/lot 5b indiquent une croissance plus grande des Lc. Le s/lot 8b présente le pH le plus élevé (pH 6,69) donc une activité métabolique minimale, ce pH étant proche de celui du pH initial du milieu M17 (7,2).

Il ressort de ce qui précède que :

- l'addition du Glc et/ou les staph. semble améliorer la croissance des Lc bovins dans la culture de Lc incubée pendant 18 heures (SNBa) ;
- la croissance des Lc bovins incubés pendant 24 heures (SNBb), dans une culture pure additionnée de Glc ou dans une culture mixte additionnée de Glc) semble entraver la croissance des Lc. Etant donné que l'addition seule des staph., semble améliorer la croissance de la souche productrice, nous pouvons penser que l'inhibition de la croissance des Lc bovins est due à la présence du Glc ;
- enfin dans le cas des Lc bovins, le passage de la durée d'incubation de 18 heures à 24 heures d'une culture pure et sans addition de Glc (témoin 5b) améliore la croissance des Lc.

3.4. Neutralisation des SNC et SNB : étude de l'activité antimicrobienne de la bactériocine

Pour éliminer l'effet inhibiteur de l'acidité produite par les souches de Lc, à l'égard de la souche cible (*Staphylococcus aureus*), le pH des surnageants subit une neutralisation par NaOH 5N préalablement stérilisée.

L'activité antibactérienne de la nisine susceptible d'être contenue dans les surnageants a été étudiée selon trois tests: test des puits, des spots et des disques. La présence d'une activité antibactérienne est déterminée par l'apparition d'une zone d'inhibition (ZI).

3.4.1. Test des puits

Pour le test des puits, aucune ZI n'est apparue (Photo 14). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par KERAMANE,(2009). Cet auteur ayant testé le surnageant natif (pH entre 5.7 et 6.2) et le surnageant neutralisé de neuf souches de lactocoques bovines à l'égard de 10 souches de *Staphylococcus*, n'a relevé aucune zone d'inhibition. Dans le même ordre d'idée, HOLO *et al.*,(2002) rapportent que la production des bactériocines dans un milieu liquide est très faible alors que sa production en milieu solide est importante. En plus de cela les bactéries lactiques ont un fort potentiel à fixer de grandes quantités de peptides cationiques, tels que les bactériocines, probablement sur les acides teichoïques et lipoteichoïques chargés négativement de leur paroi (HOLO *et al.* 2002 ;RAJARAM *et al.*,(2010) ; SHARMA *et al.*, 2010). Cela peut être une cause de l'absence de zone d'inhibition par non biodisponibilité possible de la nisine qui serait restée dans le culot.

Par ailleurs, la souche de *Staphylococcus aureus* était cultivée en surface et la diffusion du surnageant s'est effectuée en profondeur. A cet effet, nous supposons que la nisine contenue dans le surnageant n'a pas pu entrer en contact avec la souche cible ou que son taux était insuffisant.

Une faible concentration de nisine dans le surnageant peut être une autre cause de l'absence de ZI. Dans le même contexte, LYON et GLATZ, (1993), ont trouvé que la production de propionine PLG-1 par les bactéries probioniques était si faible que l'activité antibactérienne n'a pas pu être détectée qu'après une concentration du surnageant.



Photo 14: Étude de l'activité antibactérienne de la nisine par le test des puits

3.4.2. Test des spots

La recherche de l'effet de la nisine sur la souche cible par le test des spots n'a montré de ZIdans aucune boîte de pétri. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par KERAMANE (2009) pour des souches utilisées pour un test préliminaire D'après ROSSLAND *et al.* (2003), ayant testé l'activité antimicrobienne des souches de *Lactococcus lactis* à l'égard de *Bacillus cereus*, il existerait une différence de comportement d'inhibition entre les souches d'une même espèce de *Lactococcus lactis* (variation intra-espèce). Par ailleurs, ÇADIRCI et CITAK (2005), dans une étude de l'activité antibactérienne des bactériocines, suggèrent un contrôle de la méthode des spots par celle des disques, plus adaptée pour la recherche de cette activité dans le surnageant.



Photo 15 :Étude de l'activité antibactérienne de la nisine par le test des spots

3.4.3. Méthode des disques

Les tests par la méthode des disques a permis de mettre en évidence une activité antibactérienne (photos16). En effet, dans toutes les boîtes de pétri, on observe l'apparition de ZI. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XIV. Les diamètres des ZI situés entre 6 et 8 mm, enregistrés dans la présente étude sont relativement petits par rapport à ceux rapportés par la littérature (KERAMANE ,2009 ; DOUMANDJI, 2010).

Ce résultat peut avoir pour origine, la possibilité d'adsorption partielle des molécules peptidiques de nisine sur la paroi des Lc et donc son élimination avec le culot (HOLO *et al.*, 2002 ;RAJARAM *et al.*, (2010) ; SHARMA *et al.*, 2010). Il peut être aussi du à la faible concentration de la nisine dans le surnageant (HOLO *et al.*, 2002) . Par ailleurs, le diamètre des zones d'inhibition varie selon le type de milieu de culture utilisé et l'espèce utilisée comme souche indicatrice ou souche cible(TRIAS *et al.*, 2008).

Néanmoins, l'apparition de ZI, indique qu'il existe un effet antibactérien des SNC et SNB à l'égard de la souche de *Staphylococcus aureus* isolée à partir d'un échantillon de lait bovin. Rappelons que l'inhibition due à la production d'acides organiques, du diacétyle et celle de H₂O₂, a été levée par la neutralisation des SN, et par la propriété catalase + de la souche cible ; le diacétyl ayant une activité inhibitrice contre les GRAM négatif plutôt que contre les GRAM positif. Cela signifie que l'apparition des ZI est due uniquement à la production de bactériocine (type nisine) par *Lactococcus lactis subsp lactis* isolée à partir du lait des deux espèces.

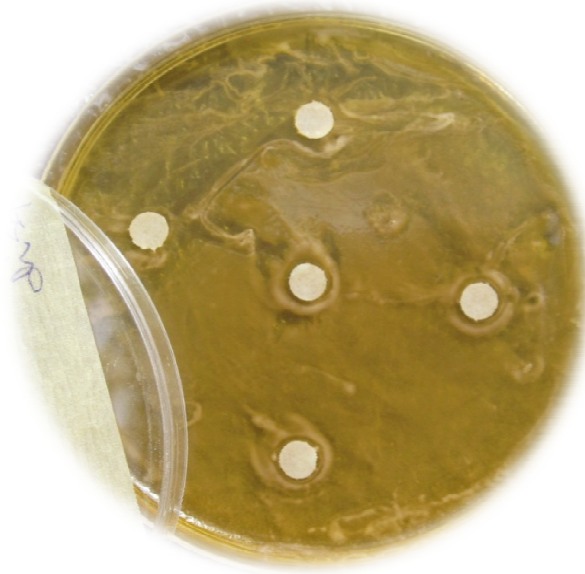


Photo 16 : Apparition des ZI par le test des disques (cas du s/lot 1b)

Tableau XIV: Diamètre de ZI

Lot N°	Sous lot	Traitement		Ø (mm)
		Glucose	<i>Staphylococcus</i>	
1	a	-	pure	6
	b	-	pure	8
2	a	+	pure	6
	b	+	pure	6
3	a	-	mixte	8
	b	-	mixte	6
4	a	+	mixte	6
	b	+	mixte	6
5	a	-	pure	6
	b	-	pure	6
6	a	+	pure	6
	b	+	pure	6
7	a	-	mixte	7
	b	-	mixte	6
8	a	+	mixte	6
	b	+	mixte	7

D'après les résultats des tests d'antagonisme par les disques, on remarque que la culture mixte sans addition de Glucose incubée pendant 18 heures de *Lactococcus lactis subsplactis* issue à partir du lait camelin(s /lot3a) a donné des ZI relativement plus grandes par rapport aux autres sous lots (fig.9 et 10). Les mêmes résultats sont observés pour la souche isolée à partir du lait bovin, mais les zones d'inhibition de la souche cameline sont légèrement plus grandes que celles bovines (8 mm versus 7 mm). Il semblerait que la nisine cameline serait plus efficace que la nisine bovine à l'encontre *Staphylococcus aureus*. L'addition de la souche de *Staphylococcus aureus* a probablement incité la souche de *Lactococcus lactis subsplactis* à produire plus de nisine dans un intervalle de temps relativement réduit. Ces résultats concordent avec ceux évoqués par les auteurs consultés. En effet, HENG *et al.*,(2007), rapportent que la production de bactériocine peut croître quand les cellules productrices subissent un stress nutritionnel ou environnemental.

3.4.3.1. Activité antibactérienne des SN

3.4.3.1.1. Activité antibactérienne des SNC

Parallèlement à une croissance minimale (pH 6, 37) des Lc, la figure 11 indique que le s/lot 3a présente la plus grande ZI (8mm) parmi les SNCa. Parmi les SNCb, le s /lot1b (témoin 1b) présente la ZI la plus grande avec une croissance plutôt maximale des Lc (pH 6, 17).

A partir de ces constatations expérimentales, il semblerait que :

- Lc camelins soumis à un stress (add. des staph.) produisent de la nisine en plus grande quantité. Bien que cette production soit meilleure, la croissance de la souche productrice est quelque peu entravée pour des cultures incubées pendant 18 heures ;
- une durée d'incubation plus élevée (24heures) et sans provocation de stress ni d'addition de Glc, donne une ZI plus grande avec une meilleure croissance des Lc.

Ce résultat semble en accord avec celui de SIBOUKEUR (2007) et SIBOUKEUR et MATI (2008) selon lequel, le suivi de l'évolution de la flore de contamination, halotolérante en l'occurrence, durant l'entreposage à la température ambiante (30°C en moyenne) a permis de mettre en exergue l'aspect auto-épuratif particulièrement efficace de ce lait. L'étude microbiologique entreprise par les mêmes auteurs, montre que le taux de cette flore halotolérante diminue durant les trois premiers jours de l'entreposage alors que celui des bactéries lactiques a tendance à augmenter. Ce résultat met en exergue la part des bactériocines dans le système protecteur particulier du lait camelin composé par les protéines lactosériques, les acides organiques....

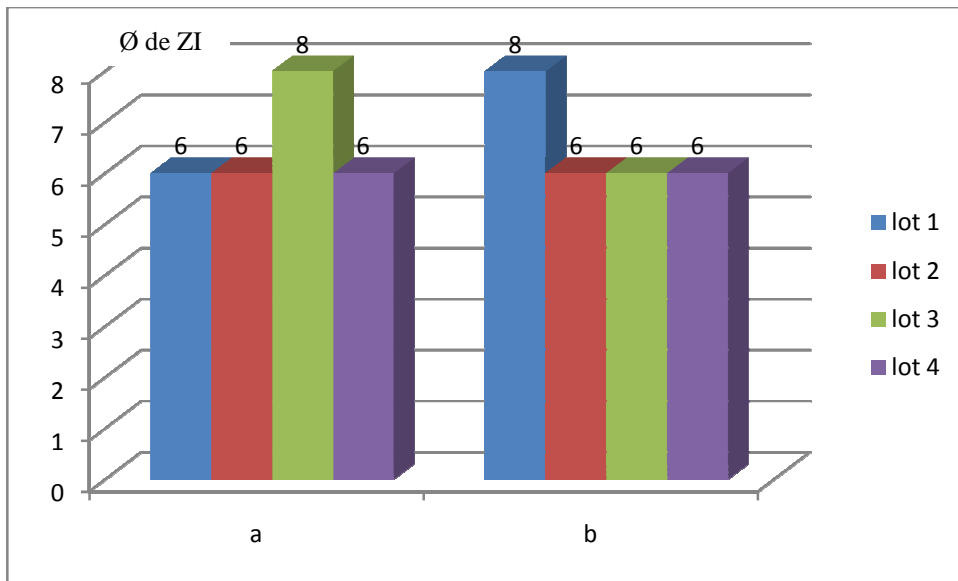


Figure 9 : Diamètres des zones d’inhibition,obtenus avec la nisine cameline
a: incubation pendant 18h b: incubation pendant 24h

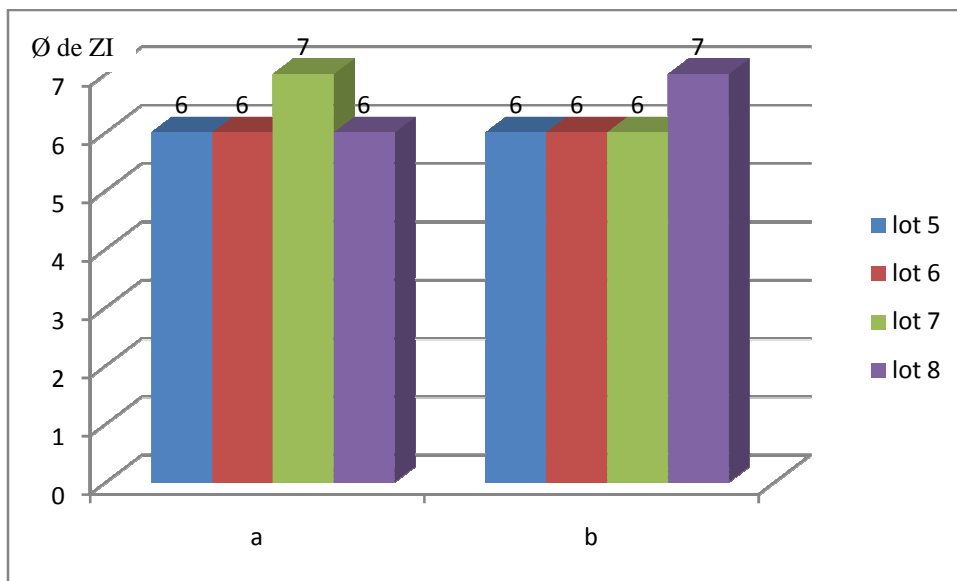


Figure10 : Diamètres des zones d’inhibition,obtenus avec la nisine bovine
a: incubation pendant 18h b: incubation pendant 24h

3.4.3.1.2. Activité antibactérienne des SNB

D'après la figures 12 on remarque que le s/lot7a présente la plus grande ZI (7mm) parmi les SNBa avec une bonne croissance des Lc (pH 6, 28). Parmi les SNBb, le s /lot8b présente la ZI la plus grande avec une croissance minimale des Lc (pH 6, 69).

A partir de ces constatations expérimentales, il semblerait que :

- le stress des Lc bovins par l'addition des staph. engendre une meilleure production de nisine et améliore leur croissance en culture incubée pendant 18 heures ;
- le prolongement de la durée d'incubation à 24 heures avec addition de Glc et de staph. donne une ZI plus grande avec une croissance minimale des Lc.

D'après les figures 11 et 12, on remarque que pendant une incubation de 18 heures, le stress des Lc bovins et camelins provoqué par l'addition des staph., provoque une augmentation de production de nisine et une amélioration de croissance observée pour les Lc bovins seulement. Dans le cas des Lc camelins le stress provoqué par addition des staph., ne semble pas être indispensable pour la production de nisine pour une culture incubée pendant 24 heures. Le prolongement de la durée d'incubation d'une culture pure et sans l'addition du Glc suffit apparemment pour avoir une bonne production de nisine.

Par contre, dans le lait bovin l'addition des staph ne semble pas inhiber la croissance des Lc. Les mammites étant très fréquentes chez les vaches (LARPENT, 1997), par rapport aux chamelles chez lesquelles les cas de mammites rapportées sont faibles (KANE *et al.*, 2003), le lait bovin est plus habitué aux attaques par l'espèce *Staphylococcus aureus* et la croissance des Lc. bovins ne semble, par conséquent, pas très gênée .

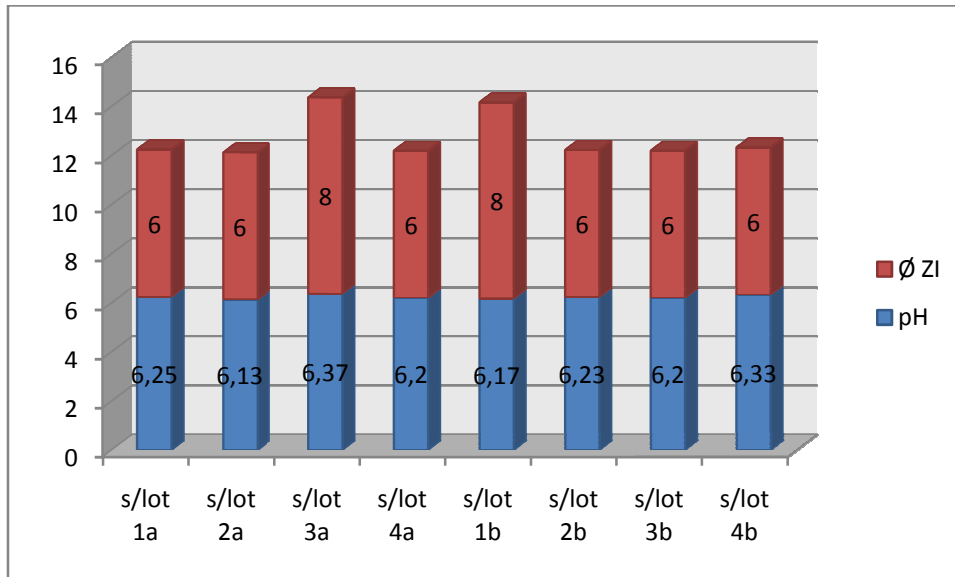


Figure 11 : Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la nisine cameline en fonction du pH du SN selon la durée d'incubation

a: incubation pendant 18h b: incubation pendant 24h

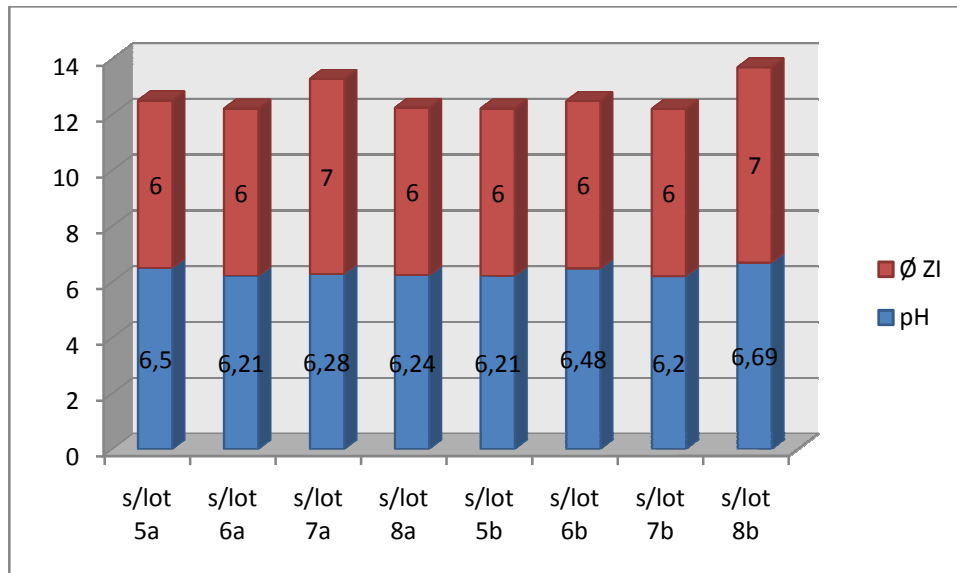


Figure 12 : Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la nisine bovine en fonction du pH du SN selon la durée d'incubation

a: incubation pendant 18h b: incubation pendant 24h

Discussion générale

Les échantillons de laits, camelin et bovin collectés présentent un pH de l'ordre 6.65 ± 0.25 et 6.68 respectivement. Bien que leurs pH soient comparables, le lait camelin présente une acidité Dornic moins élevée que le lait bovin ($14,5 \text{ }^\circ\text{D} \pm 1,37$ versus $16,75^\circ\text{D}$). Ceci est dû à l'effet tampon plus prononcé qui caractérise le lait camelin. (ABU- TARBUSCH (1996) ; KONUSPAEVA, 2007 ; SIBOUKEUR 2007).

La densité des échantillons de lait de vache égale à 1.032 en moyenne, est plus élevée que celle du lait de chamelle égale à 1.023 ± 0.0047 . La densité relativement plus faible du lait camelin est en rapport avec sa teneur en matière sèche, elle-même fortement liée à la fréquence d'abreuvement. Représentant une de ses caractéristiques, elle pose un problème pour sa transformation en fromage (SIBOUKEUR, 2007).

Les analyses microbiologiques ont montré que les échantillons de lait camelin analysés sont de bonne qualité hygiénique. KAMOUN(1990) ; YAGIL(1994) et d'autres auteurs s'accordent sur le fait que la qualité bactériologique du lait camelin peut être irréprochable si la traite est effectuée dans les conditions hygiéniques requises.

Les observations macroscopiques, microscopiques, ainsi que les différents tests physico-chimiques et biochimiques ont permis d'identifier la souche isolée sur milieu M17 pour ses propriétés de **production de bactériocines**, comme appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis*.

La souche cible n'a pu être isolée qu'à partir d'un des échantillons de lait bovin ensemencé sur un milieu sélectif. Les observations, macroscopiques et microscopiques ont permis de l'identifier comme étant une souche de *Staphylococcus aureus*. Cinq repiquages successifs en stries d'épuisement sur le même milieu ont permis d'obtenir une souche pure. L'absence de germes de *Staphylococcus aureus* dans le lait camelin est probablement dû à son système protecteur particulièrement puissant contre la flore halotolérante (SIBOUKEUR *et al.*, 2002). Par ailleurs, ce germe présente un pH optimal de croissance qui se situe entre 7 et 7.5, cas des laits mammiteux (SUTRA, 1998 in KERMANE, 2009 ; ELILLOT, 2001). Ceci n'est pas le cas du pH du lait camelin. Dans le même contexte, KANE *et al.*, (2003) n'ont pas pu détecter de signe clinique de mammites lors d'une étude menée à Nouakchott, sur 221 chamelles (*Camelus dromedarius*).

La production de bactériocines étant physiologiquement dépendante de la croissance de la souche productrice (De VUYST et LEROY, 2007), une optimisation des conditions de culture de celle-ci est réalisée dans le but essentiel d'obtenir une production optimale de nisine. La croissance de la souche dépend de son activité métabolique liée, elle-même, à la production d'acide lactique (BEAL *et al.*, 1994) et donc à la diminution du pH. Le pH des SN étant plus faible (entre pH 6,13 et pH 6,69) que celui du milieu de culture M17 (pH 7,2), indique une croissance des Lc par le métabolisme du lactose. Globalement, le pH des SNC est légèrement plus faible que celui des SNB après mise en culture des Lc suivie d'une centrifugation. **Cela semble indiquer que la croissance des souches Lc camélins est relativement plus grande.**

Pour une culture de Lc camélins, incubée pendant 18 heures, les résultats obtenus semblent indiquer que l'addition de Glc, permet l'amélioration de leur croissance alors que le stress (culture mixte) l'entrave. Le prolongement de la durée d'incubation à 24 heures avec l'addition de Glucose ou de staph. semble par contre, sans effet sur la croissance de la souche. **Enfin dans le cas des Lc camélins, le passage de la durée d'incubation de 18 heures à 24 heures d'une culture pure et sans addition de Glc (témoin 1b) améliore la croissance des Lc.**

Pour une culture de Lc bovins, incubée pendant 18 heures, l'addition de Glc et/ou les staph. semble améliorer leur croissance. Le prolongement de la durée d'incubation à 24 heures d'une culture pure additionnée de Glc ou celui d'une culture mixte additionnée de Glc) semble entraver la croissance des Lc. Etant donné que l'addition des staph. seulement, semble améliorer la croissance de la souche productrice, nous pouvons penser que l'inhibition de la croissance des Lc bovins est due à la présence du Glc. **Enfin comme dans le cas camélin, le passage de la durée d'incubation de 18 heures à 24 heures d'une culture pure de Lc bovins, sans addition de Glc (témoin 5b) améliore leur croissance.**

Les tests d'antagonisme de la nisine à l'encontre des staph. par les deux méthodes à savoir test des puits et des spots n'ont pas donné de ZI. A cet effet, plusieurs raisons peuvent être suggérées :

- L'adsorption de la nisine sur la paroi des cellules productrices, entraînant une faible concentration de ce peptide antibactérien dans les SN ;
- la faible production de la nisine dans le surnageant ;
- l'absence d'un contact direct entre la souche cible et les SN.

Le test des disques a permis au contraire, de mettre en évidence la présence d'antagonisme. La culture pure et sans addition de Glucose, incubée pendant 24 heures (témoin 1b ou s/lot 1b) et la culture pure additionnée de staph. et incubé pendant 18 heures ont permis de donner les plus grandes ZI ($\emptyset = 8\text{mm}$) en ce qui concerne les SNC. Dans le cas des SNB, le même résultat est obtenu pour la culture incubée pendant 18 heures ($\emptyset = 7\text{mm}$). Pour celle incubée pendant 24 heures, les plus grandes ZI ($\emptyset = 7\text{mm}$) sont obtenues, en culture mixte sans addition de Glucose.

Les différents résultats obtenus mettent en évidence la possibilité de l'existence d'une relation entre la croissance des Lc et la production de nisine. **De même qu'ils indiquent que la production de nisine par les souches Lc camelins est relativement plus grande ($\emptyset \text{ ZI} = 8\text{mm}$ versus $\emptyset \text{ ZI} = 7\text{mm}$).**

❖ Dans le cas des Lc camelins :

- Pour une incubation de 18 heures, la croissance des Lc camelins ne suit pas la production de nisine en cas de stress provoqué par l'addition des staphylocoques, étant donné que dans ce cas, **la production de nisine est maximale ($\emptyset \text{ ZI} = 8\text{mm}$) et la croissance des Lc est minimale (pH 6,37). Donc, la production de nisine par les Lc semble se faire dans ce cas, au détriment de leur croissance.**
- **Pour une incubation de 24 heures, une meilleure croissance (pH 6,17) et une meilleure production de nisine ($\emptyset \text{ ZI} = 8\text{mm}$) sont enregistrées.**

❖ Dans le cas des Lc bovins :

- Pour une incubation de 18 heures, contrairement au lait camelin, la croissance des Lc (pH 6,28) ne semble pas être gênée par le stress puisqu'elle suit la production de nisine ($\emptyset \text{ ZI} = 7\text{mm}$).
- Pour une incubation de 24 heures, la culture avec addition de Glc et de staph. donne une ZI plus grande ($\emptyset \text{ ZI} = 7\text{mm}$) avec une croissance minimale des Lc (pH 6,69).



Conclusion

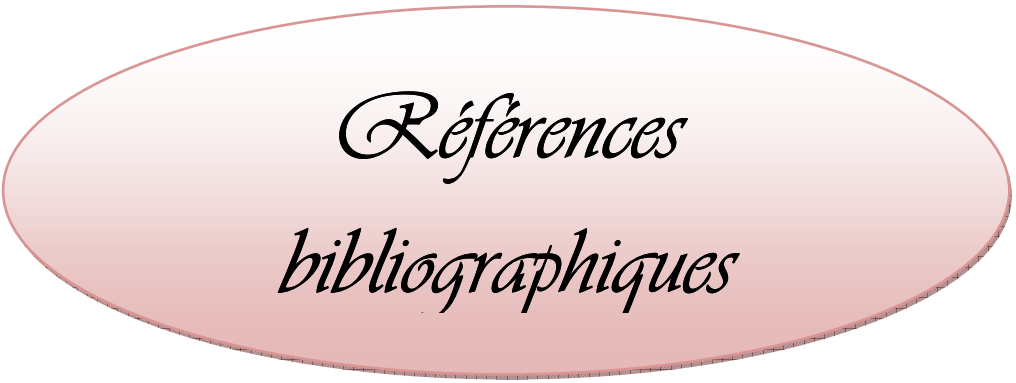
Conclusion

Le lait camelin se distingue par un système protecteur particulièrement efficace par rapport aux laits des autres espèces. Ce dernier est lié à l'existence en quantités très appréciables, de protéines protectrices contenues dans le lactosérum (le lysozyme, les immunoglobulines, la lactoperoxydase, la lactoferrine, le PP 3), par du peroxyde d'hydrogène ; par des acides organiques.

La présente étude montre que ce système naturel est renforcé par l'action non négligeable de la nisine produite par l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis*. Cette bactériocine est particulièrement efficace contre une espèce susceptible de contaminer accidentellement le lait *Staphylococcus aureus* et qui selon de nombreux auteurs a acquis une grande résistance aux antibiotiques. Il semble que l'effet synergique, des protéines lactosériques, des acides organiques, de H₂O₂ et **la nisine**, soient responsables de l'effet auto-épuratif du lait camelin entreposé, et qui peut durer quelques jours. Cet effet existe dans le lait bovin, mais il ne dure qu'une heure.

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

- ✓ D'approfondir l'étude sur l'optimisation de la production de nisine en jouant sur la nature du milieu de culture, la concentration de l'inoculum, la température et la durée d'incubation, la souche cible utilisée ... ;
- ✓ déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
- ✓ concentrer la nisine par lyophilisation ou par purification en vue d'une large utilisation dans le secteur agro-alimentaire et cosmétique.



*Références
bibliographiques*

- **ABIDI K. (2001).** Contribution à la connaissance du lait camelin : étude de l'évolution de la microflore du lait entreposé à la température ambiante et à 4 °C. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Agronomie Saharienne. Université de Ouargla.
- **ABU-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. and AL-ROYLI M.A. (1998).** Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.*, **81**, 354-361.
- **ADAMOU M.A. (2009).** L'élevage camelin en Algerie : Système à rotation lente et problème de production, profils hormonaux chez la chamelle CHAAMBI. Thèse de Doctorat en Biologie Appliquée. Université Badji Mokhtar- Annaba.Algerie.
- **AL HAJ O. A. et al KANHAL H.A.,(2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20 (2010) 811-821 *International Dairy Journal* 20 .811-821. Ed Elsevier.
- **ALLOUCHE F. N., HELLAL A. , LARABA A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue « Nature et Technologie »*. n° 03. Pages 13 à 20.
- **AL-MOHIZEA I.S., ABU-LEHIA I.H. and EL-BEHERI M. (1994).** Bacterial growth pattern in pasteurized camel's milk. *Egypt. J. Dairy. Sci.*, **22**, 243-252.
- **AMELLAL H. (1995).** La filière lait en Algérie:entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. *Options Méditerranéennes, Sér. B / n°14, 1995 - Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000.*
- **ANONYME -1 (2005).** Journal EFSA 314. Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission concernant. L'utilisation de la nisine (E 234) en tant qu'additif alimentaire. Question numéro EFSA-Q-2005-031. Résumé d'avis Journal EFSA 314.
- **ANONYME -2 (2002).** Food and Agriculture Organisation (FAO).
- **BADAOUI D. (2000).** Contribution à la connaissance du lait de chamelle : essai de caractérisation de protéines par électrophorèse sur gel de poly -acrylamide (PAGE). Mémoire d'ingénieur. Université de Ouargla.

- **BARBOUR E.K., NABBUT N.H., FRERICHS W.N. and AL NAKHLI H.M.** (1984). Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk ; relation to whey lysozyme and stage of lactation. *J. Food Protect.*, 47, 838-840.
- **Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Frerichs, W.M., Al-Nakhli, H.M., Al-Mukayel, A.A. (1985).** Mastitis in *Camelus dromedarius* in Saudi Arabia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 17: 173-179.
- **BAYOUYB K., ELOTMANI F., ASSOBEI O., JAOUA S., SOUKRI A.** (2006). Contribution à l'étude des bacteriocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raib ». congrès international de biochimie. Agadir.
- **BEAL C. DESCHAMPS N. JUILLARD V. RICHARD J. SARAUX B.** (1994) cinétique de croissance et d'acidification des bacteries lactique. bacteries lactique.
- **BENT MOHAMED A. et MINT SIDI BABA A.** (2007). Manuel de travaux pratiques de microbiologie. Université de Nouakchott faculté des sciences et techniques département de Biologie.
- **BHUNIA A.K. (2008)** staphylococcus aureus. in « Foodborne microbial pathogens ». eds. Springer science, business media LLC. New York. P.126
- **BOUDJENAH S., KADRI M., SIBOUKEUR O., MATI A. (2009).** Etude de la composition minérale du lait de chamelle collecte dans le Sud-Est Algérien. Recueil des résumés. Séminaire international. Protection et Préservation des Écosystèmes Sahariens. Le 13,14 et 15 Décembre. Ouargle.
- **ÇADIRC B.H.I et ÇITAK S. (2005).** A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition* 4 (4): p 237-241. Asian Network for Scientific Information
- **CASALTA E. et MONTEL M.C. (2007).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *IJ. Food Microbiol.* 126, 271-273.
- **CASTRO, R. NEVES A. R., FONSECA L. L., POOL W. A., KOK J., KUIPERS O.P., SANTOS H. (2009).** Characterization of the individual Glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcUpermease. *Molecular Microbiology* 71(3), 795–806
- **CHEHMA A. (2003).** Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique .Niamey 5-8 Novembre. Niger.

- **CHEIGH C.I., PARK H., CHOI H. J. et PYUN Y.R. (2005).** Biotechnology Letters Ed Springer.27: 155–160.
- **CHERFI M. (2003).** Potentialités laitières des chameilles (*Camelusdromedaries*) de la population Sahraoui. Mémoire d'ingénieur, Université de Ouargla.
- **CHOI H. J., CHEIGH C. I., KIM S. B. ET PYUN Y. R. (2000).** Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcuslactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. Journal of AppliedMicrobiology 85, 88, 563-571.
- **DAOUDI L. (2000).**Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcuslactis*ssp. *lactis*biovar. *diacetylactis* UL719. , Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.). Faculté des études supérieures. Université Laval .Canada.
- **De VUYSTL. et LEROY F. ,(2007).**Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: production, purification, and food applications.J Mol Microbiol Biotechnol13.Kanger. p194–199.
- **DE WIT.J.N.(1998).** Nutritional and fonctional characteristics of whey proteins in food products.journal of draiy science,81, Elsevier.p597-608.
- **DELLAGLIO F. ; DE ROISSART H. ; TORRIANI S. ; CURK M.C. ; JANSSENS D. ,(1994).**Caracteristiques générale des bacteries lactiques in « Bacterie lactique » ,de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- **DESMAZEAUD M.J. et de ROISSART H. (1994).** Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- **DIOP M.B.,DAUPHIN R. D. , TINE E. , NGOM A. , DESTAIN J. , THONART P.(2007).**Bacteriocin producers from traditional food products.Biotechnol. Agron. Soc. Environ 11 (4), p275–281.
- **DOUMANDJI A., HELLAL A., SAIDI N., (2010).**Purification de la bacteriocinea partir de *Lactobacillus acidophilus*11. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 4, N°2, p : 25-47
- **DUHAIMAN A.S (1988).** Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Comp. Biochem. Phys.*, 91, p793-796.

- **EI SAYED I., EL AGAMY E.SA., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. and ASSAF R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy Res.*, 59,p169-175.
- **EL KHASMI M., RIAD F., SAFWATE A. , EL ABBADI N., FARHM., FAYE B., COXAM V.(2005).**La chamelle allaitante face au stress calcique : une fonction endocrine adaptée aux conditions désertiques. Science et changement planétaire. Sécheresse volume 16. N° 4. p261-267.
- **ELLIOT T. R. (2001).**Public health Concerns. In “Applied dairy microbiology” second edition. ELMER H.MARTH, JAMES L. STEELE. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 705p.
- **FARAH Z. (1993).** Composition and Characteristics of Camel Milk; review.*J. Dairy Res.*, 60, p 603-626.
- **FARAH Z. , ABDULKADIR O., ABDURAHMAN SH. (2004).**Milk and meat from the camel: hand book on products and processing. vdfHochshuleverlag AG ander ETH Zürich.230p.
- **FAYE B. (2003).** Performances et productivité N laitière de la chamelle: les données de la littérature. Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique .Niamey 5-8 Novembre. Niger
- **FAYE B. et MULATO O.C. (1991).** Facteurs de variation des paramètres protéo-énergétiques, enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. *Rev. Elev. Méd. Vét. des Pays Trop.*, **44**, p 325-334.
- **FILIPOVITCH, DJ. 1954.** Etude sur les variations de la densité du lait de mélange. *Le lait* 34 (333-334). p 129-132
- **GIRARDET J.M. , CODDEVILL B., PLANCK Y., S'TRECKE G. ,CAMPAGNA S. ,SPKL G. et LINDEN G.(1995).** Structure of glycopeptides isolated from bovine milk component PP3. *Eur. J. Biochem*234,p939-946 . PEBS.
- **GONG X. , VISSCHER L. A. M., NAHIRNEY D., VEDERAS J.C. , DUSZYKM. (2009).**The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochimica et BiophysicaActa* 1788 .p1797–1803.Elsevier
- **GORBAN A.M.S.AND IZZELDIN O.M.(2001).** Fatty acids and lipids of camel milk and colostrum. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52,p 283–287

- **GORBAN A.M.S. and IZZELDIN O.M. (1999).** Study on cholesteryl ester fatty acids in camel milk lipid. *International J. Food Sci. Techn.* 34, p229-234.
- **GUIRAUD J.P.,(1998).** Analyse du lait. Microbiologie alimentaire. Ed DUNO.651
- **HENG N. C. K., WESCOMBE P.A. , BURTON J.P.(2007).**The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria.Bacteriocins: Ecology and Evolution .Ed. by M.A. Riley and M.A Chavan. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- **HOLO H.FAYE T., BREDE D.A., NILSEN T., ODEGÂRD I., LANGSRUD T., BRENDEHAUG J., NES I.(2002).**Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* 82,59-68.
- **ITO A., SATO Y.,KUDO S.,SATO S., NAKJIMA H. , TOBA T. ,(2003).** Thescreening of hydrogen peroxide- producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food- brone pathogens. *Current microbiology*.47, p231-236.
- **JACK R. W., JOHN R., TAGG A., BIBEK R. (1995).**Bacteriocins of Gram Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*.59 (2). P 171-200.
- **JAY H.J. (1982).** Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Applied and environmental microbiology*, 44,p 525-532
- **JIN M, ROSARIO W, WATLER E, CALHOUN DH (2004)** Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from *Staphylococcus leei* and determination of subunit structure. *Protein Expr. Purif.* 34(1):111-117
- **KAMOUN M. (1990).** La production de fromage à partir du lait de dromadaire.*Optionmédit.*,12, 119-124.
- **KAMOUN M. ,(1995).** Le lait de dromadaire : production,aspects quantitatifs et aptitude à la transformation. *Option Médit.*, 13.p81-103.
- **KANE Y. , ALAMBEDJI-BADA R., AHMED O M., DIOP A., DIALLO B.C, KABORET Y., ABIOLA F.A. (2003b).**Dépistage de mammites subcliniques chez la chamelle en lactation à Nouakchott (Mauritanie). *Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique* .Niamey 5-8 Novembre. Niger.
- **KANE Y., ALAMBEDJI- BADA R., AHMED M. O., DIOP A., DIALLO B.C., KABORET Y., ABIOLA F.A. (1994).** Dépistage de mammites subcliniques chez la chamelle en lactation à Nouakchott (Mauritanie). *Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique* .Niamey 5-8 Novembre. Niger.
- **KANEA. DIOPA., ISSELMOU E., KABORET1 Y., OULD MEKHALLE M. et**

- **KARAM H., KARAM N-E.(2006)**, Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicicultura*, **24**, 3, 153-156
- **KELLY W.J., DAVEY G. P, WARD L. J.H. (1998)**. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables.1998. *International Journal of Food Microbiology* 45 .p85–92. Elsevier.
- **KERAMANE B.,2009**. Effets antimicrobiens des Lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus* multi- résistant. Mémoire de magister en microbiologie appliqué. Université de Béjaia.
- **KHASKHELI M., ARAIN M.A., CHAUDHRY S., SOOMRO A.H., and. QURESHI T.A. (2005)**. Physico-Chemical Quality of Camel Milk. *Journal of Agriculture et Social Sciences. Vol. 1, No. 2* .164–166
- **KIM W. S.,REN J. , DUNN N. W. (1999)**. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by their adaptive response to stresses.FEMS *Microbiology Letters* 171.p57-65.
- **KLAENHAMMER T.R., FREMAUX C. et HECHARD Y. (1994)**. Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques ; in " Bactéries Lactiques I"., de Roissard et Luquet, Tech. Doc., Lavoisier, Paris.
- **KLOOS WE. (1980)**. Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 34: 559 -592
- **KLUYTMANS J, VAN BELKUM A, VERBRUGH H. (1997)**."Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks". *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (3).p 505–20.
- **KONINGS W., POOLMAN B., DRIESSEN A. J. M., SMID E.J., MOLENAAR D. (1994)**.Mécanismes du transport des nutriments dans les bacteries lactiques in « Bacterie lactique »,de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- **KONUSPAYEVA G., FAYE B., SERIKBAEVA. (2003)**. Les produits traditionnels à base de lai de chamelle en Asie centrale. Atelier international sur le lait de chamelle en Afrique. actes de l'atelier. Niamey. Niger.
- **LARPENT J.P., COPIN M. P., GERMONOVILLE A., JACQUET M. ,THETAS J. L.(1997)**. Microbiologie du lait et des produit laitier in : «microbiologie alimentaire » ed. Laprent, tec. Doc., 1 ère Ed., Lavoisier, Paris.

- **LARPENT-GOURGAUT M. , MICHAUX O. , LARPENT J. P. , DESMASURES N. , DESMAZEAUD M. , MANGIN I. , MASSON F. , MONTEL M.C. , TAILLIEZ P. (1997).** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: in : « Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.
- **LE LAY C. 2009.** Mise en évidence et caractérisation *in vitro* de l'activité antifongique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bi *ardiacetylactis* UL 719, sur *Candida albicans*. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.). Faculté des études supérieures. Université Laval .Canada.
- **LEHNINGER A. L.(1981).** Biochimie bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2^{ème} Ed, Flammarion médecine-science.
- **LYONW.J., GLATZ B.A. (1993).** Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*, Appl. Environ.Microbiol. 59 p83–88.
- **MADIGAN M., MARTINKO J. (2007).** Biologie des microorganismes. Edition PEARSON EDUCATION, 11^{ème} édition., Paris . p145-146
- **MAHBOUB N. (2010).** Contribution à l'amélioration de la fromageabilité du lait camelin : Étude des conditions de conservation des enzymes gastriques camelines (type présure). Mémoire de magister en biochimie et analyse des bioproduits. Université KasdiMerbahOurgla.
- **MAL G. et PATHAK K.M.L. (2010).** Camel milk and milk products. Milk & milk products. National Research Centre on Camel, Bikaner, Rajasthan. India
- **MARCHAL N., OBRE A., BUTTION R., BOUDON J.L. et RICHARD C.L. (1982).** Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2^{ème} Ed., Paris
- **MEHAIA M.A. (1993a).** Fresh soft white cheese (Domiaty type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation. *J. Dairy Sci.*, **6**, 2845-2855
- **METLEF S., DILMI-BOURAS A. (2009).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Revue Nature et Technologie. N° 01. P33 à 44.
- **MORRISON W.R.,(1968).** Fatty acid composition of milk phospholipids. *Lipids*. 3, p 107-110.
- **NES I. F., HOLO H. FIMLAND G., HAUGE H. H., ET NISSEN-MEYER J.,(2002).** Unmodified Peptide-Bacteriocins (Class II) Produced by Lactic Acid

Bacteria. Peptide antibiotics: discovery, mode of action, and application. Ed Marcel Dekker. Copyright.

- **NEVES A. R., WIETSKE A. P., KOK J., KUIPERS O. P., SANTOS H. (2005).** Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR. Elsevier .FEMS Microbiology Reviews 29 .p531–554.
- **NISSEN-MEYER J., HOLO H., HAVARSTEIN L. S., SLETTEN K. AND NES I. F. (1992).** A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *J. bacteriol.*, 174, N°17. p5686 - 5692.
- **NYKÄNEN A.; LAPVETÄINEN A.; HIETANEN R.M.; KALLIO H. (2000).** Applicability of lactic acid and nisin to improve the microbiological quality of cold-smoked rainbow trout. Bibliomer N°11. Thème: 2Transformation. Sous-thème :2 - 2 Procédés de transformation.
- **OBIED, A.-I., BAGADI, H.-O., MUKHTAR, M.-M. (1996).** Mastitis in Camelus dromedaries and the somatic cell content of camel milk. *Res. Vet. Sci.*, 61: 55-58.
- **OLEIVERA A. P. , NIELSEN J., FORSTER J., (2005).** Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiology*.5,p39.
- **PAQUET D., ALAIS C. et AUBERT F..1982.** Purification et quelques caractéristiques moléculaires du " composant-3 " des protéose-peptones. *Le lait. Dairy science and technology*. Volume 62.p 338-349
- **PAQUET D.1989** Revue bibliographique : la fraction protéose-peptone du lait. *Lait*, 69, p1-21
- **PARADA L. J., CARON C. R., BIANCHI A. MEDEIROS P. et SOCCO C. R. (2007).** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian archives of biology and technology*. Vol.50, N°3. p.521-542.
- **PIARD J.C., MURIANA P. M., DESMAZEAUD M. J. et KLAENHAMMER T. R. (1992).** Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58. p 279-284
- **POUMEYROL M. et LAFARGE V. (1997).** Staphylococcus à coagulase positive in « microbiologie alimentaire: technique de laboratoire. LARPENT J.P0. Ed .tec et doc., Lavoisier. Paris.1073p.

- **RAHAL K. (1984).** *Staphylocoques pathogènes* : « Résistances aux antibiotiques ». Office des publications universitaires. Alger.
- **RAIMBIAULT M. (1995).** Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc. Transformation Alimentaire du Manioc. Éd AgborEgbe T., Brauman A., Griffon D., Trèche S, éditions ORSTOM.
- **RAJARAM G., MANIVASAGAN P., THILAGAVATHI B., SARAVANAKUMAR A. (2010).** Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology 2 . N°2.p 138-144. Maxwell Scientific Organization.
- **RALPH W. JACK, JOHN R. TAGG, et BIBEK RAY.(1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria microbiological reviews. Vol. 59, P171–200
- **RAMET J. P. (2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger
- **RAMET J.P. (1993).** La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113.
- **RAYNAL-LJUTOVAC K., BARRAL J., GABORIT P., GUILLET I., BOIVIN J. E. CREMOUX R.,BEUVIER E., POUTREL B.(2008)** . Inhibition naturelle de la croissance de *S. aureus* dans les fromages au lait cru de chèvre. Renc. Rech. Ruminants, N°15. p115.
- **REA M. C., SIT C.S., CLAYTON E., O'CONNOR P.M., WHITTAL R.M. , ZHENG J., VEDERAS J. C., ROSS R. P., ET HILL C . (2010).**Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. Edited by TODD R. KLAENHAMMER, North Carolina State University, Raleigh, NC,.PNAS . Vol. 107. N°. 20. p9352–9357.
- **RILEY M. A. et WERTZ J. E.(2002)** . Bacteriocins: Evolution, Ecology,and Application. Copyright.Annu. Rev. Microbiol.N°.56.P117-137
- **RONGNE P. , HAUEN C., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., PER EUGEN K.,(2009).** Three dimensional structure of two peptide bacteriocinplantaricin J K. Peptides. Elsevier .N°30 .p1613–1621
- **ROSSLAND E. ANDERSEN BORGE G.I., LANGSRUDA T., SORHAUGA T.(2003).** Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. Ij. Food Microbiol. 89, 205-212.

- **RYFFEL S. (2006)** Transformation du lait. Le fromage de brebis suisse, un produit de niche à fort potentiel de croissance.
- **SAIDI M., SIBOUKEUR O., OULED BELKHIR A., GUERRADI.(1999).** Caractéristiques physico-chimiques, composition et qualité bactériologique du lait de chamelle population sahraoui(Wilayates de Ouargla et Ghardaïa). Aptitudes technologiques. 1^{ères} Journées sur la recherche cameline, 25 au 27 Mai, ITAS, Ouargla
- **SAWAYA W. N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A. et al-MOHAMMAD H. (1989).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci.*, **49**, 744-747.
- **SBOUI A., KHORCHANIT., DJEGHAM M. et BELHADJO. (2009)** .Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique SCIENCE 05(2) (2009) 293 – 304.*
- **SCHILLINGER et LUCKE.1989.** Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 55. N°8. Copyright. American Society for Microbiology.
- **SHARMA S., GARG A.P., SINGH G.,(2010).** Optimization of fermentation condition by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. *Journal of Dairy science*.5 (1).1-9
- **SIBOUKEUR O., MATI A. (2008).** Etude de l'activité du composant 3 des protéoses- peptones (PP3) du lactosérum camelin sur la flore microbienne, de contamination et indigène, du lait de chamelle (*Camelus dromedarius*) : Blida. Séminaire international / La biotechnologie au service du secteur agro-alimentaire (SIBA 2008) 17-18 juin Tipaza Alger.
- **SIBOUKEUR O., MATI A. et ABIDI K. (2002).** Caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du lait de chamelle. Congrès International sur «l'éco-développement dans les pays arabes », 26-28 mars, Assiut, Egypte.
- **SIBOUKEUR O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-Harrach-Alger.
- **SINGLETON P, (2004).** Bactériologie pour la médecine, biotechnologie, la biologie et les .6 éd.DUNO. paris p 440.

- **SMAIL R. (2002)**. Isolement et caractérisation des protéines majeures du lait de chamelle collecté dans les régions de Ouargla et de Tamanrasset. Mémoire de Magister en BIOCHIMIE et Microbiologie. U.A.M. DE Bejaia.74 p.
- **SOBOLEV E. M. Et MACARENKO V.A. (1977)**. Microbiologie technique. Travaux de laboratoire. Institut national des industries légères. Chaire de la microbiologie technique et de la technologie des céréales.
- **SORENSEN E. S.And PETERSEN T.E. (1993)**.Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from the proteose peptone fraction of bovine milk. J.Draiy res. , 60, p 535-542
- **SOUKI H., (2009)**. Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie : portée et limites. Revue Campus N°15. Revue Scientifique trimestrielle. Université Mouloud Mammeri. Tizi- Ouzou.
- **TERROINE E.F (1966)**. Technique de détection et de dénombrement des microorganismes du lait. Cahier technique .édition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 50p.
- **TEUBER M. et GEIS A. (2006)**. The Genus *Lactococcus*. In « The prokaryotes » 3ème 2DITION. A hand book of biology of bacteria. Ed Springer. New York.205-228.
- **THOMPSON J. et GENTRY-WEEKS C.R. (1994)**. Métabolisme dessucres par les bacterieslactiques. in « Bacterie lactique »,de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- **TODOROV S. D. (2009)**. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*– production, genetic organization and mode of action. Brazilian Journal of Microbiology 40:209-221
- **TODOROV S.D.; HOB P.; VAZ-VELHO M.; DICKS L.M.T. (2009)**. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. Meat Science. Ed Elsevier.
- **TRIAS R., BAÑERAS L., BADOSA E., MONTESINOS E. (2008)**. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. Journal of Food Microbiology 123.p 50–60
- **VADAMODE G.,CHIRIEF J., SCORZA O.C.(1981)**. An examination of minimal water activity for *S.aureus* ATCC6538Pgrowth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. Journal of food science.47.1259-1262

- **VERNOZY- ROZAND C. (1997).** Méthode d'identification des Staphylococcus. in « microbiologie alimentaire » : technique de laboratoire. LARPENT J.P0.ed .tec et doc., Lavoisier.Paris.1073p
- **WANGO J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Composition of Milk from 3 Camels (*Camelus dromedarius*) Breeds in Kenya during Lactation. *Milchwissenschaft*, **53**, 136-139
- **WARDANI A. K., EGAWA S., NAGAHISA K. SHIMIZU H., SHIOYA S.(2006).** Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis* .Biochemical Engineering Journal 28 p220–230. Ed Elsevier
- **WERNERY, U., KAADEN, O.-R. 1995.** Infectious Diseases of Camelids. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Allemagne, 133 p.
- **Xia L., Yoon-Kyung C., Shang-Tian Y., Ahmed E. Y.(2005).** Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis* .ProcessBiochemistry 40 .p13–24. Ed Elsevier
- **YAGIL, R., ZAGOSKI, O., VAN CREVELD, C. 1998.** Science and camel's milk production: some keys for nutrition and marketing. Actes du colloque : « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994, Collection Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 79-86
- **YAKHLEF H., (1989).** La production extensive de lait en Algérie.*CIHEAM.Optionsmediterraneennes- SerieSeminaires – N° 6* : 135-139
- **ZALAN Z., NEMETH E., BARATH A. ET HALASZ A. (2005).** Influence of Growth Medium on Hydrogen Peroxide and Bacteriocin Production of *Lactobacillus* Strains.*Food Technol. Biotechnol.* **43** (3) 219–225.



Annexes

Annexe 1 : Production mondiale du lait de chamelle**Tableau I** : Production laitière caméline (en tonnes de lait) (ANONYME 1,2002)

Pays	Tonnes de lait
Afghanistan	8 100
Algérie	8 000
Arabie saoudite	89 000
Chine	14 400
Djibouti	5 900
Emirats arabes unis	33 400
Erythrée	5100
Ethiopie	22 450
Iraq	672
Kenya	25 200
Jamahiriya arabe libyenne	2 000
Mali	54 900
Maroc	3900
Mauritanie	21 500
Mongolie	1 000
Niger	10 800
Qatar	13 300
Somalie	850 000
Soudan	82 250
Tchad	21 800
Tunisie	1 000
Yémen	9 500
Total	1 283 672

Annexe2 :Acidité Dornic

1. Réactif

- Solution d'hydroxyde de sodium(NaOH) : solution titrée (0.11N) soude Dornic.1 ml de cette solution correspond à 0.01g d'acide lactique. Elle peut être préparée en diluant à 1000 ml, 111ml de solution d'hydroxyde de sodium 1N.

-Phénolphtaléine : solution à 1g dans 100ml d'éthanol à 95-96%

2. Appareillage :

-matériel courant de laboratoire :

-Burette graduée en 0.05 ml ou0.1ml

-Erlenmeyer 100ml

-Pipette de 10 ml

- Balance de précision

3.Mode opératoire

- Dans un erlenmeyer introduire 10 ml de lait (ou peser 10g de lait à 0.001g près)

-Ajouter 0.1ml de la solution de phénolphtaléine

- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au virage au rose. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes(AFNOR ,1980 in ABIDI,2001.)

❖ acidité normale : 15 à 17° D pour un lait cru (GUIRAUD,1998)

14 à 16°D pour un lait pasteurisé

❖ acidité augmentée (fermentation lactique ou addition de $K_2Cr_2O_7$)

26°D : lait coagulant par chauffage

70°D : lait coagulant à température ordinaire

❖ acidité diminuée (addition de $NaHCO_3$ ou Na_2CO_3)

4.Expression des résultats

L'acidité est exprimée en grammes d'acide lactique par litre du lait

$$A = 10 \times V_1/V_0$$

V_0 : volume de lait de la prise d'essai, en ml

V_1 : volume de la solution d'hydroxyde de sodium en ml

A/ Acidité

Si l'on veut exprimer l'acidité en degré Dornic (D°) on multiplie le volume de la solution d'hydroxyde de sodium (0.11N) par 10 ($A = 10 \times (10 \times V_1)/V_0$)

Annexe3 : Test de la réductase

1. Réactif

-Bleu de méthylène 0.5%

2. Appareillage

-Bain marie à 37°C

-10 tubes à essais munis de bouchon

-Bêcher 100ml

-Pipette de 10 ml

3. Mode opératoire

-Dans un tube, mettre 1 ml de la solution de bleu de méthylène 0.5% dans 10 ml de lait cru

-Agiter le tube manuellement

-Placer le tube dans un bain marie à 37°C

-Noter avec précision le temps de cette immersion. Le niveau du bain marie doit être supérieur à celui du lait dans le tube.

-Suivre la réaction toutes les demi-heures. Les tubes décolorés sont retirés et le temps d'apparition de la décoloration doit être noté. Ceux dont le contenu reste bleu sont retournés une seule fois chaque demi- heure et soumis à une incubation plus prolongée jusqu'à disparition de teinte bleutée. Il persiste souvent une zone colorée au contact du lait avec l'air ; ne pas en tenir compte pour l'interprétation(LARPENT *et al.*,1997).

Selon LARPENT *et al.*,1997 on peut approximativement estimer les résultats du test de bleu des méthylène de la façon suivante :

Durée de décoloration en heures	Nombre de germes/ ml	Qualité du lait
5 heures et plus	100.000 à 200.000	Bonne
2 à 4 heures	200.000 à 20000.000	Bonne à passable
Moins de 2 heures	2 à 10 millions	insuffisante

La réfrigération du lait à la ferme, son transport en citernes isothermes obligent à modifier la technique recommandée ci-dessus. Le maintien du lait des températures voisines de + 4°C pendant 1 à 2 jours prolonge considérablement la durée de réduction des colorants. Il valorise l'interprétation de la qualité bactériologique du produit qui, en fait, n'est pas toujours meilleure. Il est donc conseillé de soumettre les laits réfrigérés à une préincubation à +13°C durant 18 heures avant de pratiquer la recherche du temps de réduction du bleu de méthylène.

Le tableau ci- dessous représente les résultats obtenus qui se rapproche davantage de ceux obtenus avec les laits crus non refroidis (LARPENT *et al.*, 1997).

Durée de décoloration en heures	Nombre de germes / ml
5 heures	12 à 20.000
4 heures	30 à 50.000
2 heures	1 à 2 millions
1 heure	6 à 10 millions

Annexe 4 : Préparation des dilutions

La dilution est réalisée afin de diminuer le nombre de colonies. Le meilleur résultat (colonies isolées) est statistiquement obtenu pour des boîtes comportant entre 30 et 300 colonies (MADIGAN *et al.*, 2007).

1 ml de lait camelin ou bovin collecté est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette préalablement stérilisée. On aspire et on refoule le lait au moins une fois dans la pipette, avant d'effectuer le prélèvement. La pipette ne doit pas être plongée de plus de 1 à 2 cm dans le lait.

La prise d'échantillon est introduite aseptiquement dans un tube contenant 9 ml de diluant. La pipette ne doit pas entrer en contact avec le diluant.

Le tube est agité doucement mais suffisamment pour rendre la dilution homogène. Il faut éviter le barattage survenant au cours d'une agitation trop violente.

A d'une nouvelle pipette stérile, aspirer et refouler le mélange à plusieurs reprises et prélever 1 ml de la première dilution (1/10), la pipette plongeant de 1 à 2 cm dans le liquide. Le millilitre de dilution est introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml de diluant, on obtient ainsi la dilution au 1/100.

Une troisième opération est effectuée de la même manière afin d'obtenir une dilution au 1/1000. Une quatrième opération est réalisée afin d'obtenir une dilution de 1/10000. Une nouvelle pipette stérile est employée pour chaque temps de ces dilutions (TERROINE, 1961).

Annexe5: Composition du M17

La composition est (g/l)(LARPENT *et al.* ,1997):

-peptone de soja	5
-peptone de viande	2.5
-peptone de caséine	2.5
-Extrait de levure	2.5
-Extrait de viande	5
-lactose	5
-Acide ascorbique	0.5
-Glycérophosphate de sodium	19
-Sulfate de magnésium	0.25
-Agar	15
-eau distillée	1000 ml

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°C.

Annexe 6 : Composition du milieu Chapman

Pour les staphylocoques on utilise le milieu Chapman qui est utilisé spécifiquement pour les bactéries halotolérantes. Sa composition (g/l) est (LARPENT *et al.* ,1997) :

- Peptone	10
- Extrait de viande	1
- NaCl	75
-Mannitol	10
-Agar	11 à 18
-Rouge de phénol	0.025
-Eau distillée	1000 ml

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°C.

Annexe 7 : Coloration de Gram

Préparation de frottis

Au moyen d'une boucle d'inoculation, on dépose un peu d'eau sur une lame porte objet propre, puis on mélange à cette eau un tout petit peu de matériel prélevé sur une colonie pour obtenir une suspension de cellules. Avec la même boucle, on étale cette suspension sur une surface d'un ou deux centimètres carrés et on laisse sécher – on obtient un frottis .Le frottis est ensuite fixé par deux passages rapides dans la flamme d'un bec bunsen.

Le frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium)et de nouveau rincé rapidement (SINGLETON,2004).

On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95%), l'acétone ou l'acétone iodée. Il s'agit là de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui –ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules GRAM-négatives seront incolores, les cellules GRAM- positives violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine basique diluée, pour colorer en rouge les cellules GRAM-négatives présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif (x100) à immersion (SINGLETON,2004).

Annexe 8 : Caractéristiques de l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis*

Espèces	Production d'acide par fermentation de :																												
	Adonitol	Amidon	L-Arabinose	Amygdaline	Arbutine	Cellobiose	Galactose	β -Gentibiose	Glycérol	Glycogène	Inuline	Lactose	Maltose	Mannitol	Mélibiose	Mézézitose	α -Méthyl-D-glucoside	α -Méthyl-D-mannoside	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicine	L-sorbose	Sorbitol	Saccharose	Tréhalose	D-Tagatose	D-Turanose	D-Xylose
<i>Lc. garvieanae</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	V	V	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	V	+	V	-	-
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i>	-	V	-	-	+	+	+	-	-	-	V	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V
<i>Lc. lactis ssp fordnizae</i>	-	V	-	-	+	+	-	+	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	V
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	-	V	-	V	+	+	+	+	-	-	V	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	V	+	-	-	V
<i>Lc. piscium</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Lc. plantarum</i>	-	-	-	+	+	+	-	V	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	V
<i>Lc. raffinolactis</i>	-	+	V	V	+	+	+	V	-	V	V	+	+	V	+	+	V	-	+	-	V	+	V	-	-	+	+	V	+

Résumé

Le lait camelin se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en lysozyme, en lactoperoxydase, en lactoferrine, en composant-3 des protéose-peptones (PP3), en acides organiques, en peroxyde d'hydrogène et en bactériocines produites par les bactéries lactiques. L'étude s'inscrit dans ce cadre et consiste à étudier d'une part, l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique isolée à partir de lait camelin ensemencé sur milieu M17, à l'égard d'une autre souche, pathogène isolée à partir d'un échantillon de lait, sur le milieu sélectif de Chapman et d'autre part, à évaluer son importance par rapport au système protecteur. Parallèlement une étude comparative a été effectuée avec le lait bovin. Des examens macroscopiques, microscopiques, ainsi que des tests physico-chimiques et biochimiques ont permis d'identifier la souche lactique productrice de nisine, comme étant une souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. D'autres examens macroscopiques et microscopiques, ont permis d'identifier la souche cible, comme étant une souche de *Staphylococcus aureus*. Une optimisation des conditions de production de nisine, par la souche productrice isolée puis purifiée par cinq repiquages successifs, a été réalisée. Pour se faire, nous avons procédé à la supplémentation du milieu M17 par du Glucose à 1% et /ou par des staphylocoques.

Les tests d'antagonisme de la nisine à l'encontre de la souche cible par les méthodes des puits et des spots n'ont pas donné de zones d'inhibition. Le test des disques a permis au contraire, de mettre en évidence la présence d'antagonisme. Ainsi, les résultats obtenus sont de nature à indiquer que la production de nisine par les souches de Lc camelins est plus grande en cas de stress de la souche, provoqué par addition de staphylocoques, pour une durée d'incubation de 18 h. De même qu'ils indiquent que la production cameline de nisine est relativement plus grande par rapport à celle bovine (\emptyset ZI = 8mm versus \emptyset ZI = 7mm). En relation avec la croissance, la production de nisine cameline semble maximale (\emptyset ZI = 8mm) avec une croissance minimale des Lc (pH 6,37). Un optimum de croissance des Lc camelins (pH 6,17) et un optimum de production de nisine (\emptyset ZI = 8mm) sont enregistrés pour une durée incubation de 24 heures,

Mots clefs : Lait, chamelle, Lactocoques, nisine, Staphylocoque, antagonisme

Abstract

Camel milk is different from other milks by the presence of a very powerful protective system, linked to relatively high rates in lysozyme, in lactoperoxidase, in lactoferrin, in component -3 of proteose-peptone (PP3), in organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins produced by lactic acid bacteria. The study falls into this context and is to study the one hand, the antibacterial activity of bacteriocins (nisin type) produced by lactic strain isolated from camel milk inoculated in M17 medium, against another strain, with its pathogen and isolated from a sample of milk, on the selective medium of Chapman and on the other hand, to evaluate its relative importance to the protective system. At the same time a comparative study was performed with bovine milk. Macroscopic and microscopic examination, and physicochemical and biochemical tests have identified the lactic strain producing nisin, as a strain of *Lactococcus lactis subsplactis*. Other macroscopic and microscopic examination, have identified the target strain, as a strain of *Staphylococcus aureus*. An optimization of nisin production conditions, by the producing strain isolated and purified by five successive subcultures, was performed. To do this, we performed supplementation of M17 medium with 1% Glucose and / or staphylococci.

Tests of antagonism of nisin against the target strain by the methods of wells and spots did not give inhibition zones. On the contrary, the discs test allowed, to highlight the presence of antagonism. Thus, the results are likely to indicate that the production of nisin by Lc camel strains is larger in case of stress of the strain, caused by the addition of staphylococci, for an incubation period of 18 h. Also they indicate that the production of camel nisin is relatively higher compared to bovine ($\text{ZI} = \text{Ø} = 8\text{mm}$ versus $\text{ZI} = \text{Ø} = 7\text{mm}$). In relation to the growth, production of camel nisin appears maximum ($\text{ZI} = \text{Ø} = 8\text{mm}$) with a minimum growth of Lc (pH 6, 37). An optimum growth of camels Lc (pH 6.17) and an optimum production of nisin ($\text{ZI} = \text{Ø} = 8\text{mm}$) are registered for a period of incubation of 24 hours.

Keywords: Milk, camel, lactococcus, nisin, Staphylococcus, antagonism

ملخص

يتميز حليب النوق مقارنة مع أنواع الحليب الأخرى بوجود نظام حماية قوي جدا، مرتبط باحتوائه على معدلات عالية نسبيا من الليزوزيم (lysozyme)، اللكتوبروكسيداز (lactoperoxidase)، اللكتوفرين (lactoferrine)، ال-3 (PP3) الأحماض العضوية، بيروكسيد الهيدروجين وال bacteriocines المنتجة من طرف البكتيريا اللاكتيكية. هذه الدراسة تندرج في هذا السياق فهي من جهة تدرس النشاط المضاد للبكتيريا (نوع nisine) التي تنتجها سلالة من البكتيريا اللاكتيكية المعزولة من حليب النوق في وسط M17، ضد سلالة أخرى، ضارة معزولة من عينة من الحليب، و مزروعة في وسط خاص (milieu Chapman) ومن ناحية أخرى، تقيم أهمية هذا النشاط بالنسبة لنظام الحماية. في الوقت نفسه تم إجراء هذه الدراسة بالمقارنة مع حليب البقر. وقد حددت اختبارات الفحص المجهرية والفحص بالعين المجردة، والاختبارات الفيزيوكيميائية والبيوكيميائية نوع السلالة المنتجة للنزيرين (nisine)، أنها من نوع *Lactococcus lactis subsp. lactis*. كما أن اختبارات أخرى مجهرية وبالعين المجردة، حددت نوع السلالة المستخدمة في اختبار النشاط المضاد على أنها مكورات عنقودية ذهبية (*Staphylococcus aureus*). وقد أجري تحسين لظروف الإنتاج المثالية لـ nisine، من طرف السلالة المعزولة والمنقاة عن طريق النقل الخمسة مرات متتالية وذلك بإضافة كميات من الجلوكوز (1%) أو المكورات العنقودية الذهبية للوسط M17.

اختبارات النشاط المضاد للنزيرين (nisine) ضد السلالة المستهدفة (*Staphylococcus aureus*) باستعمال اختبار puits et spots يعطي مناطق كبح (zones d'inhibition) على العكس اختبار الأقراص (disques)، الذي أثبت وجود zones d'inhibition. أيضا، النتائج تشير إلى أن إنتاج nisine بواسطة البكتيريا اللاكتيكية المعزولة من حليب النوق يكون أكبر في حالة توتر السلالة المنتجة التي تحدثها إضافة العنقوديات، لفترة حضانة مدتها 18 ساعة. كما أنها تشير إلى أن إنتاج nisine من طرف البكتيريا اللاكتيكية لحليب النوق مرتفع نسبيا بالمقارنة مع nisine المنتجة من طرف البكتيريا اللاكتيكية لحليب الأبقار (Ø ZI = 8mm مقابل Ø ZI = 7mm). بالنسبة للعلاقة بالنمو فإن إنتاج nisine يظهر أقصى حد له (Ø ZI = 8mm) مع الحد الأدنى من نمو ال Lc (pH 6,37). تم تسجيل معدل نمو الأمثل Lc المستخرجة من حليب النوق (pH 6,17) والإنتاج الأمثل لـ nisine (Ø ZI = 8mm) أثناء فترة حضانة مدتها 24 ساعة.

كلمات المفاتيح: حليب، النوق، *Lactococcus*، nisine، المكورات العنقودية، نشاط مضاد