

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach -Alger

THÈSE

Présentée par :

M^{me} BENTOURA SELLAM Amira

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Sciences et Qualité des aliments

THÈME :

L'étude des propriétés technologiques et antagonistes des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelle « *Camelus dromedarius* » vis-à-vis de certains contaminants pathogènes pour une utilisation en industrie alimentaire

Soutenu le :

Devant les membres de jury:

Mr AMIALI Malek, Professeur, ENSA,.....Président

Mr BITAM Arezki, Professeur, ENSA,..... Directeur de thèse

Mme AZZAG Naouelle, MCA, ENSV,Examinatrice

Mr AOUCHE Adel, MCA, ESSAIA,.....Examinateur

Année Universitaire 2017/2018

Remerciements

En premier lieu, je remercie dieu, le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier, qui m'a guidé avec la bénédiction de mes parents dans la voie de la lumière et de la science et du savoir pour réaliser cette thèse.

Toutes les expressions de l'estime et de gratitude du monde sont insuffisantes pour exprimer mes remerciements à mes parents qui m'ont accompagné durant tout mon cursus d'étude.

J'éprouve un réel plaisir à exprimer mon éternelle reconnaissance à mon mari pour sa sollicitude à mon égard.

*Ce travail a été réalisé au niveau de Laboratoire de Microbiologie du département technologie alimentaire et nutrition humaine de L'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El HARRACH (ENSA), sous la direction de Monsieur **BITAM Arezki**, Professeur à l'ENSA, à qui j'adresse mes plus sincères remerciements d'avoir encadré mon travail.*

Recevez, mon professeur, ma grande reconnaissance pour votre disponibilité, votre aide, votre patience et vos conseils qui ont fait progresser ce travail me facilitant grandement la tâche et me permettant d'aboutir à la production de ce manuscrit.

*A monsieur **Amialli Malek**, Professeur à L'ENSA,*

JE vous exprime mes sincères remerciements pour votre aide et vos orientations. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A madame AZZAG Naouelle, Maitre de conférences à l'ENSV,

*Je vous exprime toute ma reconnaissance d'avoir bien
Voulu me faire l'honneur de participer au jury et de contribuer à
l'examinasson de ce travail. Soyez assurée de mon plus profond
respect.*

A Monsieur AOUICHE ADEL, Maître de conférences à l'ESSAIA,

*Je vous exprime toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me
faites en acceptant d'évaluer ce travail.*

*Je n'oublie pas de remercier particulièrement l'équipe de laboratoire
de microbiologie de la sarl Falait qui
m'ont accueillie aimablement et ont mis à ma disposition tous les
moyens du laboratoire pour la réalisation d'une partie de ce travail.*

*A tous les gens de laboratoire de microbiologie du Groupe Saïdal et du
centre Pierre et Marie Curie C.P.M.C de l'hôpital universitaire
Mustapha Pacha.*

*Je tiens à remercier et exprimer ma reconnaissance à mes chers amis
YAHIA et DJAMIL qui
m'ont beaucoup aidé, encouragé dans les moments très délicats.*

*Sans oublier les membres du personnel du département de technologie
alimentaire : Mohamed BENLAHMER ET Mohamed Benalia*

*Que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de
ce modeste travail trouvent ici l'expression de ma sincère
reconnaissance.*



DEDICACES

*Je tiens vivement à dédier cette thèse qui est le fruit de
tout un long chemin d'études :*

*Aux deux êtres qui l'auraient espéré plus que moi
Ma mère et mon père, êtres les plus chers et les plus
précieux dans ce monde, que dieu leur garde et leur prête
une longue vie.*

A mes beaux parents

A mon cher époux


A mes chères sœurs et mon frère

A ma sœur Faiza et son mari Mehdi.

A mon petit neveu Ramzi et ma petite nièce Lyna.

A mes beaux frères et mes belles sœurs.

*A toute ma famille et à tous les gens qui m'ont aidé et
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste
travail, soient assurés de ma profonde sympathie.*



Résumé

Le lait de chamelle est un milieu favorable pour la croissance d'une flore bactérienne protectrice. L'isolement et l'identification des bactéries lactiques présentant des aptitudes technologique et antagoniste vis à vis des germes indésirables à partir du lait cru de chamelle *Camelus dromedarius* appartenant aux nomades dans la wilaya d'Ouargla fait l'objet de ce travail. Les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont permis d'identifier quatre espèces du genre *Lactobacillus* appartenant aux espèces suivantes : *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* représentées par Lb1, Lb2, Lb3 et Lb4 respectivement. Les résultats des tests technologiques des souches lactiques isolées sont satisfaisants pour une utilisation industrielle. Les souches sont thermorésistantes, elles produisent des arômes et possèdent une activité protéolytique. Les quatre lactobacilles isolés ont présenté des cinétiques de croissance et d'acidification dans le milieu lait écrémé presque identiques durant 48h d'incubation à 30°C. Dans le but de mettre en évidence l'effet antagoniste de ces souches lactiques, nous avons étudié *in vitro* leur pouvoir inhibiteur contre six bactéries pathogènes impliquées souvent dans les cas d'intoxications et d'empoisonnements alimentaires, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* et *Shigella flexnerii*, par « la méthode d'anti biographie » ou « la méthode de diffusion des disques imprégnés ». L'effet antagoniste s'est manifesté par l'apparition des zones claires d'inhibitions autour des disques. Les potentiels inhibiteurs ont été estimés en calculant les différents diamètres des zones d'inhibition formées qui s'étendaient de 2 à 16 mm. *L.Plantarum* (Lb3) a conduit à la plus grande zone d'inhibition vis-à-vis de *S. aureus* (16mm). Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que tous les lactobacilles produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance et la prolifération des souches pathogènes testées. Des tests supplémentaires ont été nécessaires pour confirmer l'inhibition de *S.aureus* par *L.plantarum* en culture mixte, et déterminer la nature des agents responsables de l'inhibition. Les résultats obtenus ont montré que les propriétés antimicrobiennes de *L. Plantarum* résultent de l'effet combiné de plusieurs agents biologiques provenant de leurs activités métaboliques notamment les acides organiques, et d'autres substances de nature protéique dites « bactériocines ».

Mots clé : lait de chamelle, Lactobacilles, souches pathogènes, antagonisme, culture mixte, culture pure, bactériocines.

Abstract

Camel milk is a suitable substrate for the growth of protective bacterial flora. The isolation and identification of lactic acid bacteria with technological and antagonistic potentialities from camel milk *Camelus dromedarius* in south Algeria against some food-borne pathogens is the subject of this work. Morphological, physiological and biochemical tests have identified four *Lactobacillus* species: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* which are represented by Lb1, Lb2, Lb3, and Lb4 respectively. The results of technological test are satisfactory for industrial use. The strains are heat resistant; they produce flavors and have a proteolytic activity. The four isolated lactobacilli showed growth and acidification kinetics in the skimmed milk medium at 30 ° C, almost identical. In order to demonstrate the inhibitory effect of these bacteria *in vitro*, their antagonistic property was tested against six pathogenic strains often involved in food-borne illness: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* and *Shigella flexnerii* using “the antibiography method” or “the disc diffusion method”. The antagonistic effect was manifested by the appearance of inhibition zones around the discs. The potential inhibitor was estimated by calculating diameter of inhibition zones which extend from 2 to 16 mm. *L. plantarum* has shown the largest inhibition zone against *S. aureus* (16 mm) compared to other lactic strains studied. The results of the antimicrobial activity revealed that all lactobacilli isolates secreted into the culture medium inhibitory substances which are able to inactivate the growth of pathogenic strains tested. Additional tests were needed to demonstrate the inhibition of *S.aureus* growth by *L.plantarum* in mixed culture, and to determine the nature of the agents responsible for the inhibition. The results obtained showed that the antimicrobial properties of *L. Plantarum* result from the combined effect of several biological agents derived from their metabolic activities including organic acids, and other protein substances called "bacteriocins".

Key words: camel milk, Lactobacilli, pathogenic strains, antagonism, growth kinetics, mixed culture, pure culture, bacteriocins.

المخلص

يعتبر حليب النوق الوسط المناسب لنمو عدد كبير من البكتيريا الواقية. ان استخراج و عزل وتحديد اصناف بكتيرية لبنية تتميز بإمكانات وخصائص تكنولوجية و مضادة للبكتيريا الضارة و المسببة للأمراض و المنقولة عن طريق الغذاء من حليب الناقة *Camelus dromedarius* من ولاية ورقلة جنوب الجزائر يعد موضوع هذا العمل .مكنت الاختبارات المورفولوجية و الفيزيولوجية و البيوكيميائية من تشخيص اربع عزلات من العصيات اللبنية تنتمي الى الانواع التالية : *Lactobacillus acidophilus* . نتائج الاختبارات حول الخصائص التكنولوجية كانت مرضية من أجل استعمال هذه السلالات المدروسة في مجال الصناعات الغذائية و اللبنية ، و اظهرت ان السلالات المعزولة لها قدرة جيدة على رفع حموضة الوسط، هدم و تحليل بروتينات الحليب مقاومة للحرارة و تنتج النكهات. السلالات كانت لها حركية نمو و تحميض في الوسط (الحليب الخالي من الدسم) متشابهة و متقاربة فيما بينها . من أجل تسليط الضوء على التأثير المثبط لهذه البكتيريا البنية ضد للبكتيريا الضارة و المسببة للأمراض في المختبر، تم اختبارها ضد ست سلالات بكتيرية ممرضة و منقولة غالبا عن طريق الاغذية وهي : *Pseudomonas aeruginosa* ، *Salmonella Enteritidis* و *Shigella flexnerii* باستخدام طريقة النشر بواسطة الاقراص . وقد تجلى الاثر المعادي من خلال ظهور مناطق تثبيط حول الاقراص و تم تقدير امكانية التثبيط من خلال حساب مختلف اقطار مناطق التثبيط التي تراوحت بين 16 و 20 ملم في هذه الحالة.

L.Plantarum أدى إلى ظهور أكبر منطقة تثبيط مقارنة مع سلالات اللبنة الأخرى المدروسة ضد المكورات العنقودية الذهبية . كما أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن جميع العزلات اللبنية افرزت مواد مثبطة في وسط النمو كانت قادرة على كبح و تثبيط نمو السلالات المختبرة المسببة للأمراض. اختبارات إضافية كانت ضرورية لإثبات و تأكيد تثبيط نمو *S.aureus* بواسطة *L.plantarum* في الزراعة المزدوجة و من اجل تحديد طبيعة المفرزات المسؤولة عن التثبيط . اظهرت النتائج المتحصل عليها ان خاصية *L.plantarum* المضادة ضد *S.aureus* ناتجة عن التأثير المشترك لعدة عوامل بيولوجية ناشئة عن الانشطة الايضية بما في ذلك الأحماض العضوية و مواد اخرى ذات طبيعة بروتينية تسمى « البكتريوسينات » .

الكلمات المفتاحية : حليب النوق، العصيات اللبنية، البكتيريا الممرضة، التأثير العدائي، الزراعة المزدوجة، الزراعة النقية، البكتريوسينات.

Table des matières

Introduction	01
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
I- Le lait de chamelle	03
1-Aperçu sur le dromadaire	03
1-1-Origine de dromadaire.....	03
1-2- classification et systématique.....	03
1-3- Répartition géographique et effectif camelin en Algérie.....	04
2- Le lait de chamelle	05
2-1- Caractères physiques et organoleptiques du lait de chamelle	05
2-2- Caractères chimiques du lait de chamelle	05
2-3- Caractères microbiologiques du lait de chamelle	10
2-4- Propriétés thérapeutiques et médicinales du lait de chamelle	15
2-4-1- Le facteur anticancéreux.....	15
2-4-2- Le facteur antidiabétique « l'insuline ».....	16
2-4-3- Les facteurs stimulants « la vitamine C ».....	16
2-4-4- Les facteurs antimicrobiens.....	17
2.4.4.1. La lactoferrine.....	17
2.4.4.2. Le lysozyme.....	17
2.4.4.3. Les immunoglobulines.....	17
2.4.4.4. Les lactoperoxydases.....	18
2.4.4.5. Les composés antimicrobiens issus des bactéries lactiques du lait de chamelle.....	18
• Les acides organiques.....	18
• Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	19
• Les bactériocines.....	19
II- Les bactéries lactiques	
1- Définition et caractères généraux.....	23
2- L'habitat des bactéries lactiques.....	24
3- Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques.....	24
4- Les voies fermentaires des bactéries lactiques.....	26
5- Classification des bactéries lactiques.....	27
6- Intérêts et Rôles des bactéries lactiques.....	30
7- Les lactobacilles.....	36
7-1- Caractères généraux.....	36
7-2- Classification des lactobacilles.....	37
7-3- Habitat des lactobacilles.....	38
7-4- Rôle des lactobacilles.....	38
III- Les contaminants pathogènes du lait	
1- Les bactéries pathogènes du lait.....	40
1-1- Les bactéries infectieuses.....	40
1-2- Les bactéries toxigènes.....	40

2- Présentation de quelques contaminants pathogènes du lait responsables des toxi-infections et intoxications alimentaires	41
2-1- <i>Staphylococcus aureus</i>	41
2-2- <i>Escherichia coli</i>	43
2-3- <i>Salmonella</i>	44
2-4- <i>Bacillus</i>	45
2-5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
2-6- <i>Shigella flexnerii</i>	47
IV- Les interactions microbiennes	48
1- Les interactions positives	49
1-1- Le commensalisme.....	49
1-2- Le mutualisme ou la proto-coopération.....	49
2- Les interactions négatives	50
2-1- L'Antagonisme ou l'amensalisme ou l'inhibition.....	50
2-2- La compétition.....	51

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I- Matériel biologique	52
1- Les échantillons du lait camelin.....	54
2- 2- Les souches pathogènes utilisées.....	54
II- Méthodes	
1- Analyses physicochimiques du lait camelin	56
1-1- Le pH.....	56
1-2- L'acidité Dornic.....	56
1-3- La densité.....	56
1-4- La teneur en matières grasses.....	56
2- Isolement et identification des bactéries lactiques issues du lait de chamelle	57
2-1- Préparation des dilutions décimales.....	57
2-2- Isolement des souches lactiques.....	57
2-3- Purification des souches.....	57
2-4- Conservation des souches.....	57
2-5- Identification des souches lactiques isolées.....	58
2-5-1- Critères morphologiques.....	59
2-5-2- Critères physiologiques.....	59
2-5-3- Critères biochimiques.....	60
3- Etude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle	64
3-1- Le pouvoir acidifiant (Production d'acide lactique).....	64
3-2- Pouvoir protéolytique (Protéolyse des caséines du lait).....	67
3-3- Pouvoir aromatisant (Production des composés aromatiques).....	67
3-3-1- Production d'acétoïne.....	67
3-3-2- Hydrolyse du citrate.....	67
3-4- Test de thermo résistance.....	68
4-L'étude du pouvoir antagoniste des isolats du lait de chamelle vis-à-vis des contaminants pathogènes du lait	68

4-1- Préparation des pré-cultures bactériennes.....	69
4-2- Détection de l'activité antagoniste des bactéries lactiques issues du lait de chamelle vis-à-vis des pathogènes testés par la méthode de diffusion des disques imprégnés sur gélose TSA.....	70
4-3- Estimation du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes testées.....	71
4-4- Confirmation de l'antagonisme par l'étude comparative de la cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> en culture pure et en culture mixte avec le surnageant brute de <i>L.plantarum</i> et la mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur.....	72
4-4-1- Confirmation de l'antagonisme de <i>L.plantarum</i> par l'étude comparative de la cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> en culture pure et en culture mixte.....	73
4-4-2- Mise en évidence de la nature chimique des substances inhibitrices.....	74
4-4-2-1- L'étude de l'effet de l'acide lactique produit.....	74
4-4-2-2- Recherche de la nature protéique des substances inhibitrices (Bactériocines).....	77
➤ Détermination du mode d'action « bactéricide ou bactériostatique ».....	77
➤ L'étude de l'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique sur l'apparition des zones d'inhibition en présence de <i>S. aureus</i>	77

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I- Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin.....	80
II- Isolement et identification des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle.....	83
1-Examens morphologiques.....	83
2-Tests physiologiques et biochimiques.....	87
3-Caractérisation préliminaire ou pré-identification des isolats du lait de chamelle.....	88
4-Identification des isolats du lait de chamelle par les galeries API 50CH.....	93
III- L'étude des propriétés technologiques des Lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle.....	96
IV- Etude des propriétés antagonistes des lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle vis-à-vis de certains contaminants pathogènes fréquents du lait.....	108
1-Mise en évidence du pouvoir antagoniste des lactobacilles isolés du lait de chamelle.....	109
2-Analyse statistique.....	112
3-Confirmation de l'antagonisme par l'étude comparative de la cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> en culture pure et en culture mixte avec le surnageant brute de <i>L. Plantarum</i> isolée à partir du lait cru de chamelle.....	121
4-Mise en évidence de la nature chimique des substances inhibitrices.....	125
4-1-L'étude de l'effet des acides organiques sur la croissance de <i>S.aureus</i>	125
4-2-L'inhibition par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	127
4-3-L'étude de l'effet des substances de nature protéique (bactériocines).....	128
4-3-1-Détermination du mode d'action « bactéricide ou bactériostatique ».....	128
4-3-2-L'étude de l'action des enzymes protéolytiques et de traitement thermique sur l'apparition des zones d'inhibition contre <i>S. aureus</i>	129
Conclusion.....	132

Références bibliographiques et annexes.

Liste des abréviations

°D : Degré Dornic.

ADH: Arginine Di-Hydrolase.

ADN: Acide Désoxyribo-Nucléique.

ADNr /ARNr : ADN ou ARN ribosomal.

API : Analytic Program Index.

ARN: Acide Ribo-Nucléique.

ATCC: American Type Culture Collection.

B.Subtilis : *Bacillus Subtilis*.

Citr: Citratase.

CO₂ : Di-Oxyde de Carbone

DM : Diamètre.

DO: Densité Optique.

E.coli: *Escherichia Coli*

FAO: Food and Agriculture Organization.

G+C: le ratio Guanine + Cytosine.

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène ou Eau Oxygénée.

kDa : Kilo-Dalton

Lb: *Lactobacillus*.

Log : Logarithme.

Mg : Milligramme.

mM : Milli-molaire

MRS: milieu de Man, Rogosa and Sharpe.

N: Normalité.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NaOH : Hydroxyde Sodium.

nm: Nanomètre.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

pH: Potentiel d'Hydrogène.

Ps.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

Sh.flexnerii : *Shigella flexnerii*.

S.enteritidis : *Salmonella enteritidis*.

Subsp : Sous-espèce.

TSE : Tryptone-Sel-Eau.

TSA : Tryptic-Soja-Agar.

UFC : Unité Formant Colonie.

Ve : Volume d'ensemencement.

Zi : Zone d'inhibition.

µL : Microlitre.

LDH : Lactate Déshydrogénase.

Liste des figures

Figure 01 : Aires de distribution du dromadaire en Algérie (Ben Aissa, 1989).....	04
Figure 02: Aspect morphologique de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (A), <i>Lactobacillus helveticus</i> (B), <i>Lactobacillus plantarum</i> (C) et <i>Lactobacillus casei</i> (D) (Kandler <i>et al.</i> , 1986).....	37
Figure 03: Aspect morphologique de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007).....	42
Figure 04 : Observation au microscope électronique de' <i>E coli</i> (Goubau et Pellegrims, 2000).....	43
Figure 05: Observation au microscope électronique de <i>S. Enteritidis</i> (Prescott <i>et al.</i> , 2003).....	45
Figure 06: Aspect morphologique de <i>B. subtilis</i> au microscope électronique (Bridier <i>et al.</i> , 2011).....	46
Figure 07: Observation au microscope électronique de <i>Ps. aeruginosa</i> (Lister <i>et al.</i> , 2009).....	47
Figure 08: Observation au microscope électronique de <i>Sh. flexnerii</i> (Clark, 2007).....	47
Figure 09 : Une chamelle laitière <i>Camelus dromedarius</i> de la population Ouled Sidi Cheikh.....	52
Figure 10 : Procédure expérimentale.....	55
Figure 11: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.....	58
Figure 12: Fiche de résultats de la galerie API50CH.....	63
Figure 13: Schéma du protocole appliqué pour l'étude de la cinétique de croissance et d'acidification sur milieu lait écrémé.....	66
Figure 14: La méthode d'anti biographie ou de diffusion des disques	70
Figure 15: Les zones d'inhibition (Zi).....	71
Figure 16: Protocole de confirmation de l'antagonisme en culture mixte et la mise en évidence du rôle d'acide lactique dans l'inhibition.....	76
Figure 17: Méthode de diffusion en puits.....	79

Figure 18: Protocole d'inactivation des substances inhibitrices d'origine protéique par l'action des protéases et de traitement thermique.....	79
Figure 19: Principales caractéristiques physico chimiques du lait camelin, en comparaison avec le lait bovin.....	80
Figure 20: Aspect des colonies de bactéries lactiques isolées du lait camelin sur milieu MRS solide.....	83
Figure 21: (a) : Aspect des colonies de bactéries lactiques dans le bouillon MRS après la croissance bactérienne.	84
Figure 22: Répartition des souches lactiques isolées selon la forme des cellules.....	85
Figure 23 : Aspects microscopiques des quatre lactobacilles Gram positive isolés à partir du lait de chamelle après coloration de Gram (G : x100).....	87
Figure 24: Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr <i>et al.</i> , 2002).....	89
Figure 25: Schéma général d'identification rapide des <i>Streptobacterium</i> (Carr <i>et al.</i> , 2002).....	89
Figure 26: Schéma d'identification rapide des lactobacilles hétéro-fermentatifs « <i>Bétabacterium</i> » (Carr <i>et al.</i> , 2002).....	90
Figure 27: Résultats des tests physiologiques et biochimiques des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle.....	92
Figure 28: Profils fermentaires de la souche <i>L.plantarum</i> avant et après l'incubation.....	93
Figure 29: Pouvoir aromatisant des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle : (a) : Hydrolyse du citrate, (b) : Production d'acétoïne.....	98
Figure 30 : Les principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.....	98
Figure 31: Pouvoir protéolytique des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle : Hydrolyse de la caséine du lait.....	99
Figure 32 : La croissance des souches lactiques sur milieu MRS solide durant 48h d'incubation à 30°C.....	102
Figure 33 : Cinétique de croissance et d'acidification des quatre souches lactiques du genre <i>Lactobacillus</i> dans le milieu lait écrémé à 30°C.....	103

Figure 34 : Cinétique de croissance dans le lait écrémé à 30°C les quatre souches lactiques.....	105
Figure 35 : Cinétique d'acidification du lait écrémé à 30°C par les quatre souches lactiques.....	106
Figure 36 : Evolution du pH des milieux ensemencés par les quatre souches lactiques.....	106
Figure 37: Quelques résultats des activités antimicrobiennes des quatre souches lactiques isolées vis-à-vis des pathogènes testés.....	120
Figure 38: Cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> en culture pure et en culture mixte avec <i>L. Plantarum</i> dans le lait écrémé à 37°C.....	122
Figure 39: Evolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en culture mixte avec <i>L. plantarum</i> pendant 8h d'incubation à 37°C sur le milieu hyper salé de Chapman.....	123
Figure 40: Evolution du pH durant l'incubation à 37°C en culture pure et en culture mixte avec et sans neutralisation du surnageant de <i>L.plantarum</i>	126
Figure 41: Effet bactéricide de <i>L.plantarum</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	128
Figure 42 : Résultats des interactions entre <i>L. plantarum</i> et <i>S. aureus</i> par la méthode des puits: (a) surnageant brute de <i>L.plantarum</i> , (b) surnageant brute de <i>L.plantarum</i> neutralisé à pH=6,5, (c) traitement avec la pepsine, la trypsine et avec la chaleur. (d) Témoin (MRS liquide).....	130

Liste des tableaux

Tableau 01: Composition chimique globale (%) du lait de chamelle (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache. (Siboukeur, 2007).....	07
Tableau 02: Composition en sels minéraux (mg/l) du lait de chamelle (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache. (siboukeur O, 2007).....	08
Tableau 03: Composition en vitamines (µg/kg) du lait de chamelle, (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache. (Siboukeur O, 2007).....	09
Tableau 04: Les principales bactériocines produites par certaines espèces de bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009).....	31
Tableau 05: exemples de bactériocines produites par l'espèce <i>Lactobacillus plantarum</i> . (Ouwehand et Vesterlund, 2004).....	32
Tableau 06: Utilisations commerciales et effets bénéfiques de quelques souches de <i>Lactobacillus</i> probiotiques (Prioult, 2003).....	35
Tableau 07: Caractéristiques des lactobacilles (Joseph, 2003).....	36
Tableau 08: Distinction des lactobacilles homofermentaires.....	38
Tableau 09: Critères différentiels des trois groupes de <i>Lactobacillus</i> (Larpent, 1997).....	38
Tableau 10: Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière (Kandler <i>et al.</i> , 1986).....	39
Tableau 11: Rôle de quelques espèces de <i>Lactobacillus</i> utilisés en industrie. (Lamontagne <i>et al.</i> , 2002).....	39
Tableau 12: Aliments suspectés et agents responsables (Rampal <i>et al.</i> , 2000).....	44
Tableau 13 : Quelques espèces les plus broutées par le dromadaire dans la wilaya d'Ouargla.....	53
Tableau 14: Échantillons du lait de chamelle collectés.....	54

Tableau 15: Milieu utilisé et conditions d'incubation pour l'isolement des lactobacilles mésophiles. (De Man <i>et al</i> , 1960).....	57
Tableau 16: Caractères macroscopiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle sur milieu MRS solide.....	83
Tableau 17: Les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats du lait de chamelle.....	88
Tableau 18: Profils fermentaires des quatre souches lactiques sur les galeries API 50 CH.....	94
Tableau 19: Résultats des tests technologiques des lactobacilles isolés : Thermo-résistance, production d'acetoïne, l'hydrolyse du citrate et de la caséine du lait.....	96
Tableau 20 : Spectre d'action des quatre souches lactiques vis-à-vis des six germes pathogènes testés.....	110
Tableau 21: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre <i>Lactobacillus fermentum</i> (Lb1) et les six pathogènes testés (DM1).....	112
Tableau 22: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre <i>Lactobacillus helveticus</i> (Lb2) et les six pathogènes testés (DM2).....	112
Tableau 23: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lb3) et les six pathogènes testés (DM3).....	112
Tableau 24: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Lb4) et les six pathogènes testés (DM4).....	113
Tableau 25 : Analyse statistique des différents effets inhibiteurs « intra-sujets » entre les quatre souches lactiques étudiées (Comparaison souche lactique- souche lactique).....	115
Tableau 26: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs intra-sujets entre les six souches pathogènes testées (Comparaison souche pathogène-souche pathogène).....	117
Tableau 27: Résultats des tests d'interaction entre <i>S. aureus</i> et le surnageant de <i>L. plantarum</i> traité par différentes enzymes protéolytiques et par la chaleur en utilisant la méthode des puits.....	129



Introduction

Introduction

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuples nomades qui le consomment habituellement à l'état cru ou fermenté. Il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée, dans la plupart des zones pastorales Sahariennes (Jrad *et al.*, 2016).

Même s'il présente une composition physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin, ce lait se distingue néanmoins par une teneur élevée en vitamine C, en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur contre la flore de contamination, lié à des taux relativement élevés en lysozymes, lactoperoxydases, lactoferrine ainsi qu'en acides organiques et bactériocines produits par les bactéries lactiques intrinsèques de ce lait. (Elagamy *et al.*, 1996 ; Diarra *et al.*, 2002 ; Haddadin *et al.*, 2008).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leurs capacités à fermenter les hydrates de carbone et à un moindre degré les protéines et les lipides mènent à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés aromatiques et antimicrobiens. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des produits fermentés (Mozzi *et al.*, 2010).

La pasteurisation, la fermentation et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne. L'emploi excessif et non contrôlé des additifs chimiques peut engendrer des risques sanitaires pour le consommateur. (Mami *et al.*, 2010 ; Franz *et al.*, 2010). En vue d'éviter l'effet des agents chimiques de conservation, ces dernières années nous constatons une augmentation de l'utilisation des bactéries lactiques pour application comme agents bio-conservateurs (Alvarez *et al.*, 2008).

La technologie laitière représente toutefois, le principal secteur d'application des bactéries lactiques. (Desmazeaud et De Roissard, 1994). Leur capacité à produire des acides organiques accompagnée de l'abaissement du pH est le facteur majeur par lequel ces bactéries inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène et le diacétyl peuvent aussi contribuer à la préservation des produits

alimentaires. De plus elles sont capables de synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines. (Meguenni *et al.*, 2011).

En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales, plusieurs travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (Karam, 1995 ; Zadi, 1998 ; Saida *et al.*, 2002 ; Guessas et Kihal, 2004 ; Cheriguenne *et al.*, 2006 ; Idoui, 2008). De même, des résultats de recherches sur la flore lactique du beurre traditionnel de vache, de brebis et de chèvre, ont été couronnés par des publications (Zadi-Karem et Karam, 2006 ; Idoui et Karam, 2008 ; Idoui *et al.*, 2009). L'isolement des bactéries lactiques à partir du lait cru de chamelle et l'étude de leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes correspond à un sujet intéressant car peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur ces microorganismes isolés à partir de ce lait (Meguenni *et al.*, 2011).

Notre présente étude répond à la nécessité d'avoir une banque de données sur l'un des patrimoines nationaux c'est les bactéries lactiques du lait de chamelle. A travers cette étude, nous allons mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant une application dans l'industrie alimentaire et déterminer ainsi certaines de leurs propriétés technologiques et antagonistes vis-à-vis de la flore de contamination.

Notre manuscrit est structuré en trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de quatre chapitres, le premier porte sur la caractérisation du lait de chamelle, le second porte sur les bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques ainsi que leurs différentes utilisations en tant que ferments lactiques et probiotiques, le troisième présente quelques contaminants pathogènes du lait et ses dérivés, pour arriver au dernier chapitre qui traite les différents types d'interactions microbiennes.

La seconde partie du manuscrit représente le matériel et les méthodes mises en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, où sont détaillés : l'étude de quelques paramètres physicochimiques du lait de chamelle collecté, les différents procédés d'identifications des bactéries lactiques isolées à partir de ce lait ainsi que certaines propriétés technologiques et antimicrobiennes. Les résultats obtenus, sont ensuite exposés et discutés dans la troisième partie du travail. Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.



*Synthèse
bibliographique*

I- Le lait de chamelle

1- Aperçu sur le dromadaire :

1-1- Origine du dromadaire :

Le nom « dromadaire » dérive du terme grecque « dromados » qui veut dire course pour son utilisation dans le transport (Souilem et Barhoumi, 2009). Il est donné à l'espèce de chameau à une seule bosse, appartenant au genre *Camelus* de la famille des *Camelidae* et dont le nom scientifique est *Camelus dromedarius*.

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

1-2- Classification et systématique :

Le dromadaire appartient à l'embranchement des vertébrés, classe des mammifères ongulés et sous classe des placentaires. Il appartient à l'ordre des Artiodactyles, sous-ordre des Tylopodes (Prat, 1993 ; Khan et Iqbal 2001; Correra, 2006) et à la famille des camélidés.

La famille des camélidés ne comprend que deux genres : *Camelus* et *Lama*. Le genre *Camelus* occupe les régions désertiques de l'ancien monde (Afrique, Asie et Europe), alors que le genre *Lama* est spécifique des déserts d'altitude du nouveau monde (les Amériques) où il a donné naissance à quatre espèces distinctes.

Le genre *Camelus* comprend *Camelus dromedarius* (dromadaire avec une seule bosse) et *Camelus bactrianus* (chameau de Bactriane avec deux bosses). Le genre *Lama* (les espèces de ce genre sont toutes sans bosse). *Lama glama* (*lama*). *Lama guanacoe* (*guanaco*). *Lama pacos* (*alpaga ou alpaca*). *Lama vicugna* (*vigogne*) (Skidmore, 2005 ; Ould Ahmed, 2009). Samman *et al.*, (1993), ont constaté d'après leur étude de caryotype sur l'espèce *Camelus dromedarius* que toutes ces espèces de la famille des camélidés sont très proches les unes des autres sur le plan génétique avec un nombre diploïde de chromosome ($2n=37$), soit 74 chromosomes (Samman *et al.*, 1993 ; Wardeh et Dawa, 1995; Ould Ahmed, 2009).

1-3- Répartition géographique et effectif camelin en Algérie :

L'effectif camelin Algérien est estimé à 268,560 têtes en 2009 (Medjour, 2014), cet effectif a connu une évolution de 9,15 % soit 344,015 têtes en 2015 (FAO, 2016).

L'effectif est réparti sur 17 wilayates, avec 75% du cheptel dans huit wilayates sahariennes : Ouargla, Ghardaia, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Béchar ; et 25% du cheptel dans neuf wilayat steppiques : Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila (Ben Aissa, 1989).

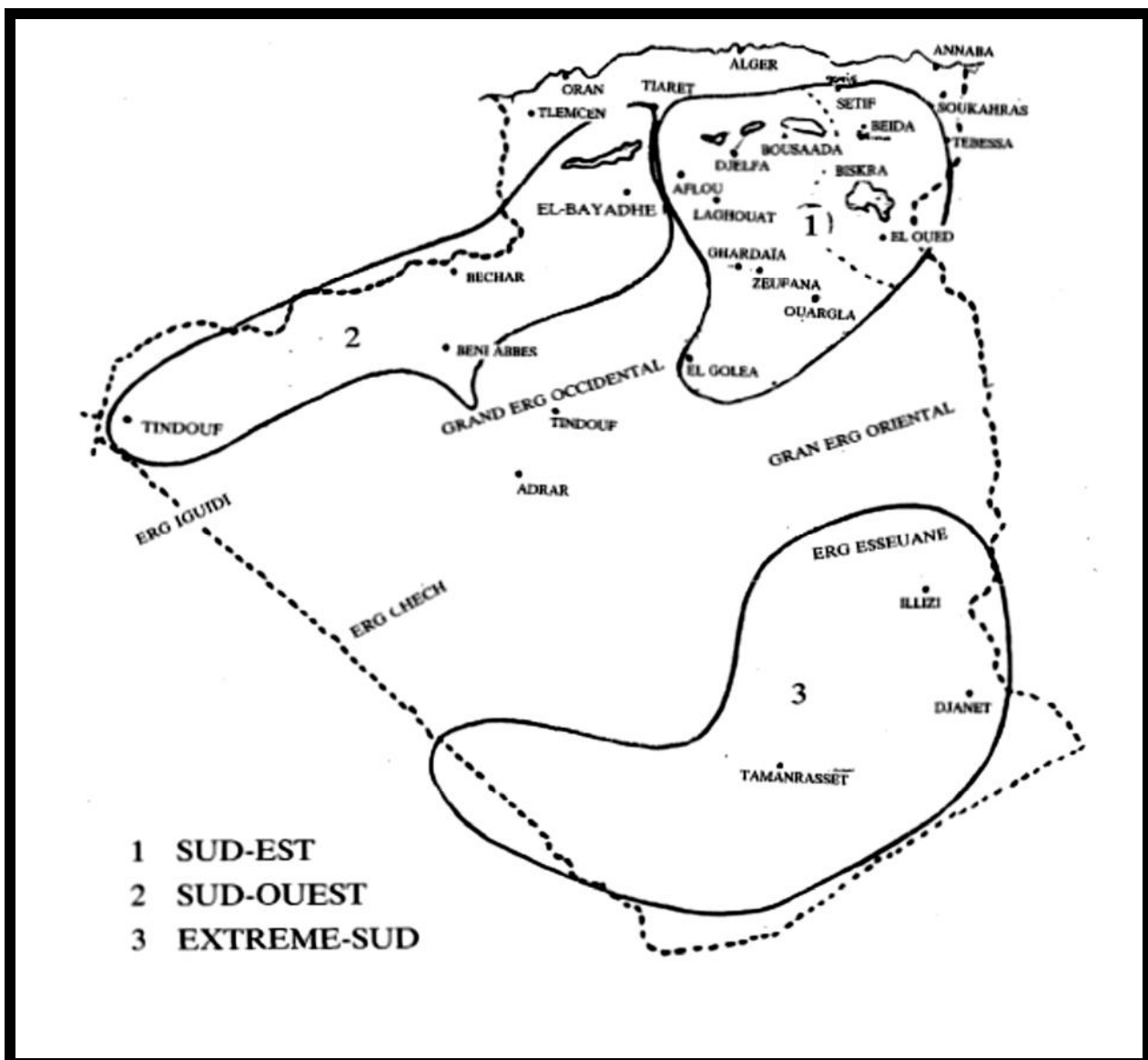


Figure 1 : Aires de distribution du dromadaire en Algérie (Ben Aissa, 1989)

2- Le lait de chamelle :

2-1- Caractères physiques et organoleptiques du lait de chamelle :

Le lait de chamelle a une couleur blanc-mat, conséquence de sa composition pauvre en matières grasses et en caroténoïdes (Sbouï *et al.*, 2009 ; Al Haj et Al Kanhal, 2010 ; Mal et Pathak, 2010). Il est légèrement sucré avec un goût acide et même salé (Yagil, 1982 ; Abdel-Rahim, 1987; Farah, 2004 ; Mal et Pathak, 2010 ; Parajapati *et al.*, 2012). Ces aspects dépendent souvent de la physionomie des pâturages et de la disponibilité de l'eau (Yagil et Etzion, 1980; Siboukeur, 2007 ; Al Haj et Al Kanhal, 2010 ; El Imam Abdalla, 2012).

Le pH du lait se situe à une moyenne de 6,6 (Khaskheli *et al.*, 2005). Le lait camelin est légèrement plus acide et moins dense que le lait bovin avec un point de congélation variant de 0,57°C à -0,61°C (Wangoh *et al.*, 1998a ; Ghennam *et al.*, 2007 ; Faye *et al.*, 2008). Sa viscosité est plus faible que celle du lait de vache (Kamoun, 1995 ; Kherouatou *et al.*, 2003 ; Al Haj et Al Kanhal, 2010).

2-2- Caractères chimiques du lait de chamelle:

La composition chimique globale du lait de chamelle, même si elle fluctue selon les auteurs (donc selon les animaux et l'environnement considéré), montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base (protéines, matières grasses et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache (**Tableau 1**).

Les teneurs en protéines et en matières grasses varient respectivement de 2,5 à 4% et de 1,1 à 4,6% (avec une fréquence élevée à des taux supérieurs à 3%), alors que la teneur en lactose fluctue entre 2,5 et 5,6%. Les concentrations élevées observées pour ce dernier nutriment expliqueraient la saveur parfois sucrée du lait de chamelle rapportée par plusieurs auteurs (Gnan et Shereha, 1986 ; Bayoumi, 1990).

La matière grasse du lait camelin qui représente une source importante d'énergie, se rapproche de celle du lait humain. Elle est de couleur blanchâtre, du fait de son déficit en β carotène, elle est dispersée dans le lait sous forme de globules gras de petits diamètres (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 de cholestérol se trouvent avec une concentration de 9,98 mg/100g. Dans la fraction estérifiée du lait de chamelle, le pourcentage des acides gras saturés est égal à 52% dont 18,4% est composé d'acide palmitique (Gorban et Izzeldin, 1999), ces acides gras prédominent. Pour les acides gras insaturés, le lait camelin contient de l'acide oléique, et de l'acide palmitoléique. L'acide pelargonique (C9 :0) et l'acide décaénoïque (C10 :1) ont été trouvés avec des quantités significatives dans le lait camelin contrairement au lait bovin. Les acides gras à courtes chaînes sont relativement peu présents (Gorban et Izzeldin, 1999).

Les protéines, source d'acides aminés essentiels, sont réparties selon leur solubilité en milieu acide, en deux fractions : les caséines et les protéines du lactosérum (albumines et globulines). Les premières précipitent à leur pH isoélectrique se situant à 4,3 (Wangoh *et al*, 1998) alors que les autres restent solubles dans cette zone de pH considérée. La teneur moyenne en protéines dans le lait de chamelle est comparable à celle du lait bovin (autour de 33g/l). La composition en acides aminés de ces protéines est aussi très similaire à celle rapportée dans le lait de référence (Sawaya *et al*, 1984 ; Mehaia et Alkanhal, 1989).

- **La teneur en eau :**

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

Tableau 1: Composition chimique globale (%) du lait de chamelle (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache (Siboukeur, 2007).

Origine du lait	Constituants (%)					Références
	Eau	MST	Lactose	MG	Protéines	
Lait de Chamelle	90,2	9,8	4,2	3,2	2,7	DESAL <i>et al</i> , 1982
	88,1	11,9	4,4	3,6	2,9	SAWAYA <i>et al</i> , 1984
	87,0	13,0	5,6	3,3	3,3	GNAN et SHEREHA, 1986
	87,4	13,4	4,8	3,2	4,0	ABDEL-RAHIM, 1987
	89,1	10,9	3,9	3,5	3,4	HASSAN <i>et al</i> , 1987
	87,8	12,2	5,2	3,2	3,1	FARAH et RÜEGG, 1991
	86,6	13,4	5,5	3,5	3,3	BAYOUMI, 1990
	88,3	10,9	4,1	3,1	2,8	ELAMIN et WILCOX, 1992
	91,3	8,7	4,5	1,1	3,2	MEHAIA, 1992
	88,0	11,9	4,7	3,9	2,5	MEHAIA, 1993a
	87,8	12,1	4,9	3,2	3,2	ABU-LEHIA, 1994
	87,3	12,6	4,5	3,4	3,3	KAMOUN, 1994
	86,9	13,1	4,9	4,6	3,0	LARSSON et MOHAMED, 1994
	90,5	9,5	3,7	3,0	2,7	ZIA-UR-RAHMAN et STRATEN, 1994
	90,0	10,0	2,5	3,3	3,3	GORBAN et IZZELDIN, 1997
Lait de vache	87,0-87,5	12,5-13,0	4,8- 5,0	3,4-4,4	2,9-3,5	MIETTON <i>et al</i> , 1994

MST : matière sèche totale

MG : matière grasse.

- **Les éléments minéraux :**

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle sont aussi diversifiés que ceux rencontrés dans le lait de vache (**Tableau 2**). On y dénombre en effet des macros et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (Sodium, Potassium, Magnésium, Calcium, Fer, Cuivre, Zinc...etc.). Au niveau quantitatif, si la composition en macroéléments (Na, K, Ca, Mg...) est relativement similaire à celle du lait bovin, le lait camelin se caractérise néanmoins par des taux plus élevés en oligo-

éléments. (Yagil et Etzion, 1980a ; Sawaya *et al*, 1984 ; Elamin et Wilcox, 1992 ; Mehaia *et al*, 1995 ; Gorban et Izzeldin, 1997 ; Bengoumi *et al*, 1994).

Le lait de chamelle est une riche source de chlorures en raison des fourrages broutés par le dromadaire, tels qu’Atriplex et Acacia qui contiennent habituellement une forte teneur en sel. (Al Haj et Al Kanhal ,2010).

Tableau 2: Composition en sels minéraux (mg/L) du lait de chamelle (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache (siboukeur O, 2007).

Origine du lait	Ca	Mg	P	Na	K	Fe	Zn	Cu	Mn	Références
Lait de chamelle	1060	120	630	690	1560	2,6	4,4	1,6	0,2	Yagil et Etzion, (1980a)
	1078	122	641	702	1586	2,64	4,47	1,63	0,20	Sawaya <i>et al</i> , (1984)
	1310	140	510	270	450	0,4	0,1	0,02	--	Gnan et Shereha, 1986)
	1160	80	710	360	620	--	--	--	--	Hassan <i>et al</i> , 1987)
	300	45	--	431	725	2,8	--	--	--	Elamin et Wilcox, (1992)
	1462	108	784	902	2110	3,4	2,9	0,1	2,0	Bengoumi <i>et al</i> , (1994)
	1180	125	889	688	1464	2,34	6,00	1,42	0,80	Mehaia <i>et al</i> , (1995)
	1182	74	769	581	1704	1,3	5	--	0,1	Gorban et Izzeldin, (1997)
	1230	90	1020	660	1720	--	--	--	--	Attia <i>et al</i> , (2000)
Lait de vache	1000 - 1500	100-150	750-1200	350-1000	1200 - 1800	0,20-0,50	2,00-5,00	0,02-0,15	0,03-0,05	Luquet,(1985) ; Mietton <i>et al</i> . (1994)

N.B : (--) : Non déterminé

- **Les vitamines :**

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamines B3 (la niacine) et en vitamine C en comparant avec le lait bovin (Haddadin *et al.*, 2008). Même si des variations importantes (de 25 à 60 mg/L) de la teneur de cette dernière dans les laits camelin sont rapportés (Farah, 1993), il n'en demeure pas moins que les teneurs signalées (autour de 36 mg/l selon Farah *et al.*, 1992) sont en moyenne 3 fois plus élevées que celles présentes dans le lait bovin, qui ne dépassent pas 22 mg/L selon (Mathieu, 1998) (**Tableau 3**).

Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité voire absente.

Farah (1993) révèle que le lait camelin contient des teneurs plus faibles en vitamines A et E et en certaines vitamines du groupe B (vitamine B2, B5 et B9) par rapport au lait bovin.

Tableau 3: Composition en vitamines ($\mu\text{g}/\text{kg}$) du lait de chamelle, (selon différents auteurs) ; comparaison avec le lait de vache (Siboukeur O, 2007).

Nature des vitamines	Lait de chamelle				Lait de vache
	SAWAYA <i>et al</i> (1984)	FARAH <i>et al</i> (1992)	MEHAIA (1994 b)	KAPPELER (1998)	FARAH (1993)
A (Rétinol)	150	100	--	150	170- 380
B1 (Thiamine)	330	-	--	600	280- 900
B2 (Riboflavine)	416	570	--	800	1200- 2000
B3 (Niacine)	4610	-	--	4600	500- 800
B5 (Acide pantothénique)	880	-	--	880	2600- 4900
B6 (Pyridoxine)	523	-	--	520	400- 630
B12 (Cobalamine)	1,5	-	--	2	2- 7
B9 (Acide folique)	4,1	-	--	4	10- 100
E (Tocophérol)	-	560	--	530	100- 200
C (Acide ascorbique)	24	37	25	24-36	3-23

N.B : (-) : non déterminée.

2-3- Caractères microbiologiques du lait de chamelle :

Le lait est un produit naturellement périssable du fait de sa teneur élevée en eau, son pH voisin de la neutralité, et de sa composition en éléments nutritifs. Le lait renferme inévitablement une microflore dont la nature et l'importance sont conditionnées par l'état sanitaire de l'animal, les conditions de traite, la température, la durée de conservation... etc. Sous des conditions rigoureuses de collecte, sa charge ne dépasse cependant pas 5.10^3 germes/mL (Larpen *et al.*, 1997).

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

❖ La microflore du lait camelin

Le lait de chamelle peut êtreensemencé par de nombreuses espèces microbiennes. Pour certaines, il constitue un bon milieu de culture, ce qui leur permet de s'y développer. Pour d'autres germes banaux ou pathogènes, il n'est qu'un véhicule occasionnel. En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories: les bactéries saprophytes et les bactéries pathogènes (Siboukeur, 2007).

A- Bactéries saprophytes :

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

➤ Flore lactique :

Les bactéries lactiques forment un groupe très hétérogène présentant les caractères généraux suivants (Pilet *et al.*, 1979) : elles sont Gram +, micro-aérophiles ou anaérobies facultatives, ne réduisant pas les nitrates. Elles fermentent les sucres dans des conditions diverses. Parmi les genres appartenant à cette flore, on cite les *Streptococcus* (ou *Lactococcus*), les *Lactobacillus*, les *Leuconostoc* et les *Bifidobacterium*.

a) Genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* joue un rôle de conservateur dans le lait. En effet, les espèces telles que *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* produisent respectivement de la « nisine » et la « diplococcine », bactériocines inhibant les bactéries non lactiques au profit des bactéries lactiques d'où leur intérêt technologique (Greaupe, 1975). Une étude réalisée par (Zadi-Karam et Karam, 2006) met en évidence la présence dans le lait de chamelle, des espèces *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* ayant une capacité inattendue de résister à une concentration de 6,5% en NaCl.

b) Genre *Lactobacillus* :

Les lactobacilles occupent une place de choix en bactériologie appliquée parmi les « bactéries utiles ». Ils appartiennent en effet, aux ferments lactiques et à ce titre, ils interviennent en industrie laitière (fabrication de yaourts, Kéfir, fromages) (Ndiaye, 1994).

(Zadi-Karam et Karam, 2006), ont montré la présence de *Lb. plantarum* comme seule espèce de lactobacilles retrouvée dans des échantillons de lait de chamelle étudiés. Cette espèce lactique a été signalée comme espèce majoritaire de la flore lactique des laits crus de vache, de brebis ou de chèvre mais toujours auprès d'autres lactobacilles, comme par exemple *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus brevis* (Bouix et Leveau, 1980).

c) Genre *Leuconostoc* :

Ce sont des germes hétéro-fermentaires. Ils coagulent rarement le lait mais sont souvent à l'origine de répugnance des denrées pour le consommateur (Mouchet, 1962). La présence des espèces, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc dextranicum*, a été signalée dans le lait de chamelle (Zadi-Karam et Karam, 2006).

d) Genre *Bifidobacterium* :

La flore bifidogène connu pour ces exigences en matière de facteur de croissance est capable de dégrader les acides aminés libres et autres composés azotés non protéiques (NPN) dont le taux est plus élevé dans le lait camelin que bovin (Siboukeur, 2007). En effet, des travaux portant sur la culture de quatre espèces (*Bifidobacterium brevis* ; *B.bifidum* ; *B.longum* et *B.angulatum*), rapportent que le lait camelin est un excellent milieu de culture, naturel, pour les Bifidobacteriums. En outre, le stockage de ce lait à 4°C n'affecte pas leur viabilité et leur activité protéolytique est plus forte que dans le lait bovin. A cet effet,

l'utilisation de la poudre de lait camelin comme milieu de pré culture de cette flore à haut potentiel nutritionnel et thérapeutique est préconisée (Abu tarboush *et al.*, 1998).

➤ **Flore d'altération :**

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

a) Flore thermorésistante :

Un certain nombre de bactéries est capable de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé. Les composantes de cette flore sont: *Micrococcus*, *Microbactérium* et *Bacillus* dont l'espèce *Bacillus cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation. Le genre *Bacillus* réalise en outre, des activités enzymatiques lactiques pouvant être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation.

b) Les coliformes :

D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétéro fermentaire. Ils peuvent se retrouver dans tous les types de lait. Ce sont des germes qui vivent dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Leur présence est un signe de contamination lors de la traite et pendant les manipulations et transvasements multiples que subissent les produits avant la commercialisation (Ba diao , 2000).

c) Les psychrotrophes :

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

✚ GRAM (-) : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Serratia*, etc ...

✚ GRAM (+) : *Micrococcus*, *Corynebactérium*, etc ...

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

d) Levures et moisissures :

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

▪ **Les levures :**

Des formes arrondies ou ovales, volumineuses ou unicellulaires, les levures sont utiles en industrie laitière car, elles peuvent servir comme agents d'aromatisation. Elles sont aérobies facultatives et se développent en surface formant les boutons de nature mycélienne. Par contre, d'autres levures : *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis* peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments. Les levures supportent des pH de 3 à 8 avec un optimum de 4,5 à 6,4. Ce qui explique leur présence dans le lait cru comme dans le lait Caillé (Bouix et Leveau, 1980). Elles entraînent des altérations rendant le produit final indésirable: aspect trouble, odeurs ou goûts anormaux, gonflement des produits ou de leur emballage.

▪ **Les moisissures :**

Les moisissures sont en général plus complexes dans leur morphologie et dans leur mode de reproduction. Elles peuvent être utiles ou indésirables en industrie alimentaire. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées en utilisant le lactose; cette propriété leur confère une utilité incontestable en fromagerie. C'est ainsi que le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* sont utilisés dans la fabrication de divers types de fromages. Mais le développement excessif de certaines moisissures comme *Géotrichum* à la surface des fromages, les rend glaireuses et coulantes, ce qui les déprécie fortement. Certaines moisissures élaborent des mycotoxines thermostables et liposolubles donc difficiles à éliminer une fois formées. Dans ce contexte, (Bouix et Leveau, 1980) signalent la résistance de l'aflatoxine M1, élaborée par *Aspergillus flavus*, à la pasteurisation des laits et produits laitiers.

B- Les bactéries pathogènes :

Le lait et les produits laitiers, de même que ceux ayant subi un traitement d'assainissement, peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme. L'animal, l'homme et l'environnement peuvent être à l'origine de cette contamination. Différentes espèces bactériennes sont capables de pénétrer dans la mamelle par le canal du trayon et sont excrétées dans le lait. Certains de ces germes en particulier, les streptocoques et staphylocoques, provoquent des mammites avec contamination du lait (Mami, 2013).

➤ Les Staphylocoques :

Ils sont fréquemment retrouvés dans le lait et parfois en nombre important. L'origine de la contamination est la mamelle et plus fréquemment l'homme. Leur fréquence tend à augmenter du fait de leur antibiorésistance. Ils provoquent, par leur production de toxines thermostables, des intoxications de gravité variable pouvant être redoutables (Mami, 2013). Une fermentation suffisamment active les inhibe. Seules certaines souches de staphylocoques appartenant aux espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus intermedius* sont capables de produire des entérotoxines (Debuyser, 1991). Les symptômes d'une toxi-infection à staphylocoques, apparaissent 2 à 4 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé. Ils se manifestent par des coliques violentes, accompagnées de nausées et de vomissements suivis d'une diarrhée incoercible avec possibilité de perte de conscience (Maillot, 1985).

➤ Les entérobactéries :

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

✚ Les Lactose (-) : *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia* ;

✚ Les Lactose (+) : *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*.

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

- Les colibacilles tels que l'espèce *Escherichia coli*, dont certaines souches sont entéropathogènes, peuvent être responsables de graves toxi-infections suite à la consommation de produits laitiers et de lait infectés. La contamination par les coliformes est très fréquente ; même légère, elle présente un risque. Des coliformes banaux absorbés en quantité massive peuvent déclencher des troubles gastro-intestinaux.
- Les Brucelles sont souvent à l'origine de la contamination du lait de vache, chèvre et de beaucoup d'autres espèces dans les pays où il n'a pas été effectué de sérieuses campagnes d'éradication. Les brucelles sont néanmoins présentes de façon exceptionnelle dans les laits caillés (Semasaka, 1986). Ceci est d'ailleurs rapporté par (Eze, 1977) qui démontre qu'à pH 4,5 toutes les brucelles sont détruites dans le lait.
- Le bacille tuberculeux (*Mycobactérium*), agent de la tuberculose, se contracte lors de consommation de lait provenant d'animaux malades principalement lors de tuberculose généralisée ou de mammite tuberculeuse des animaux (Semasaka, 1986).
- Le genre *Listeria*, notamment l'espèce *Listeria monocytogenes*, fait partie des bactéries psychrotrophes pathogènes (Eze, 1977).

2-4- Propriétés thérapeutiques et médicinales du lait de chamelle :

Le lait de chamelle est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti-infectieuse, anticancéreuse, antidiabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents. Ces propriétés relèvent cependant le plus souvent d'observations empiriques dont les fondements scientifiques mériteraient d'être précisés. Ces observations peuvent être reliées à la composition du lait de chamelle. Certains des composants tant sur le plan quantitatif que qualitatif pourraient être associés à ces propriétés particulièrement les facteurs antibactériens, l'insuline et la vitamine C. A cela s'ajoutent les propriétés probiotiques des bactéries lactiques présentes dans les produits fermentés camelins (Chethoune, 2011).

2-4-1- Le facteur anticancéreux :

La lactoferrine jouerait un rôle reconnu dans le traitement de certains cancers et ses effets anti-tumoraux ont été étudiés notamment chez le rat (Jouan, 2002). Partant de ces résultats observés en laboratoire, Chissov et Yakubovskaya (1995) ont élaboré une

préparation à base de lactoferrine à utiliser dans les zones or-pharyngiennes après une chimiothérapie. La lactoferrine est capable de participer aux processus de prolifération et de différenciations cellulaires. Elle a également été identifiée en tant que « Colony Inhibitory », agissant au niveau des cellules de la moelle épinière durant la myélopoïèse. Les cellules traitées à la lactoferrine montrent un arrêt définitif de toutes les fonctions, incluant l'arrêt de l'activité métabolique des précurseurs de l'ADN et de l'ARN (Jouan, 2002).

2-4-2- Le facteur antidiabétique « l'insuline » :

L'amélioration du statut glycémique chez les diabétiques traités au lait de chamelle serait due à la présence d'insuline en quantité importante : plus de 5000 fois la valeur observée chez la vache et 1000 fois la valeur observée chez la femme. L'insuline est normalement neutralisée lors du caillage du lait dans l'estomac sous l'effet de l'acidité du milieu, mais il semble que le lait de chamelle ne caillant pas comme ceux des autres espèces. L'insuline pourrait être conservée intacte dans l'intestin où elle pourrait être absorbée. En tout état de cause, il semble que la consommation régulière de lait de chamelle ait une action hypoglycémiant et régulatrice de la glycémie chez les patients insulinodépendants (Agrawal *et al.*, 2003 et Kanuspayeva *et al.*, 2003).

2-4-3- Les facteurs stimulants « la vitamine C » :

Le taux de vitamine C dans le lait de chamelle est 3 fois plus élevé que dans le lait de vache, soit en moyenne $37,4 \pm 11,0$ mg/L, il varie entre 26,2 et 61,1 mg/L (Farah *et al.*, 1991). La concentration en vitamine C dans le lait varie selon le stade de lactation, dans le colostrum il y a plus de vitamine C que dans le lait (Siboukeur *et al.*, 2005). Le lait des chammelles multipares est plus riche en acide ascorbique ($46,3 \pm 4,7$ mg/L) que celui des primipares ($44,9 \pm 5,8$). La concentration de vitamine C augmente tout au long de la lactation : $44,2 \pm 4,2$ mg/L à 6-89 jour, $46,7 \pm 4,0$ à 180-269 jour, $48,4 \pm 3,8$ mg/L à 270-360 jour de lactation.

La réputation du lait de chamelle est en grande partie due à sa richesse en vitamine C. De tous les laits des mammifères collectés pour les besoins de l'homme, celui de la chamelle est le plus riche en cette vitamine dont le rôle tonique permettant de lutter contre la fatigue et l'infection est bien connu (El khidir, 2002). La vitamine C joue un rôle biologique considérable par ses propriétés anti-oxydantes. Récemment, il a été montré qu'elle avait aussi une action positive sur la réponse immunitaire des organismes agressés par diverses maladies.

2-4-4- Les facteurs antimicrobiens :

2.4.4.1. La lactoferrine :

La lactoferrine est une glycoprotéine très abondante dans le lait de chamelle puisqu'on en trouve de 30 à 100 fois plus que dans le lait de vache (Kanuspayeva *et al.*, 2003). Elle contient deux sites capables chacun de fixer un ion ferrique (Fe^{3+}). Cette capacité à capter le fer, explique en partie son rôle dans le contrôle de la croissance de certaines bactéries pathogènes, telles que *S. aureus* et *E. coli* (Diarra *et al.*, 2002).

2.4.4.2. Le lysozyme :

Le lysozyme est une protéine naturellement présente dans les laits de mammifères où il représente un facteur antimicrobien puissant. La quantité de lysozyme contenue dans le lait de chamelle est plus élevée que celle du lait de vache, 15 μg /100 mL contre 7 μg /100 mL. L'activité enzymatique du lysozyme du lait de chamelle est également plus forte que celle de la vache, mais plus faible que celle de l'œuf (Elagamy *et al.*, 1996).

Le lysozyme contient une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés. Il se lie électrostatiquement sur les surfaces anioniques des bactéries. Les bactéries Gram (-) sont plus résistantes au lysozyme car elles contiennent une membrane externe de lipo-polysaccharides, qui peut protéger ces bactéries contre le lysozyme. En revanche, les bactéries Gram (+), telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, les levures, telles que *Candida albicans*, sont sensibles au lysozyme (Kanuspayeva *et al.*, 2003).

2.4.4.3. Les immunoglobulines :

Les immunoglobulines (IgG) jouent un rôle dans le système immunitaire chez les nouveau-nés. Le taux des immunoglobulines est très élevé dans le colostrum chez tous les mammifères. Cependant, la concentration d'immunoglobulines dans le lait varie selon les espèces concernées.

Du point de vue structural, les IgG du dromadaire sont plus proches des immunoglobulines humaines que de celles des autres ruminants. Le pic d'IGg dans le

colostrum est de $0,26 \pm 0,232$ mg/mL. Sa concentration dans le lait de chamelle est quatre fois supérieure à celle du lait de vache à 0 °C, et six fois plus élevée à 65 °C (El Agamy, 2000).

2.4.4.4. Les lactoperoxydases :

Les peroxydases sont des enzymes qui appartiennent aux systèmes normaux de la défense du lait. Le lait contient naturellement assez de lactoperoxydase pour que le système soit actif. L'action du système peroxydase résulte de l'oxydation de l'ion SCN^- en présence du peroxyde d'hydrogène, qui fait apparaître des molécules ayant des propriétés bactéricides. Le premier produit de l'oxydation est l'ion hypothiocyanate (OSCN^-), puis différents acides se succèdent, dont l'action inhibitrice varie en fonction des espèces microbiennes. La lactoperoxydase du lait de chamelle présente une stabilité encore plus forte vis à vis des traitements thermiques (Loiseau *et al.*, 2001).

Le puissant système protecteur du lait camelin est renforcé par l'action des composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques.

2.4.4.5. Les composés antimicrobiens issus des bactéries lactiques du lait de chamelle :

a) 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).

b) Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Est connu depuis longtemps comme agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques. Sa production peut avoir lieu selon plusieurs modes mettant en jeu des oxydases et probablement des superoxydesdismutases. (Klaenhammer *et al.*, 1994).

c) Les bactériocines :

Différentes définitions ont été données aux bactériocines au cours du temps. La définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines ribosomiales, douées d'une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice (Klaenhammer *et al.*, 1994 ; Gong *et al.*, 2009.). Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre et mode d'action. (Mami *et al.*, 2008 ; Gong *et al.*, 2010 ; Naghmouchi *et al.*, 2010).

Elles agissent à très faible concentration, de l'ordre de la pico ou de la nano mole/L (Parada *et al.*, 2007). 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. 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).

➤ Caractérisations des bactériocines :

Dans leur grande majorité, La structure des bactériocines peptidiques des bactéries lactiques est résistante à l'autoclavage, elles sont thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes), ce qui veut dire qu'elles pourraient être utilisées dans le cas de préparations subissant un traitement thermique pour la préservation dans l'industrie agroalimentaire (Bayoub *et al.*, 2006). Stables dans des zones de pH variant de 3 à 8, Sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal). Elles ont des sites de liaisons spécifiques dans la membrane des bactéries cibles. Leur synthèse est associée à la synthèse d'une protéine d'immunité qui évite de provoquer la mort de la cellule excrétrice. Elles ont un

spectre d'activité étroit. (Drider *et al.*, 2006). Ne présentent pas de nocivité apparente pour l'homme et les animaux domestiques, ce qui implique une utilisation potentielle dans les domaines agroalimentaire et thérapeutique.

Les bactériocines n'ont pas d'effet négatif sur la qualité organoleptique du produit. Elles représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes (Dortu et Thonart, 2009).

➤ **Classification des bactériocines :**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Selon leur structure primaire, poids moléculaire, stabilité à la chaleur. Ces quatre classes sont:

Classe I « Les lantibiotiques » :

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés soufrés, comme la lanthionine, la *f*3- méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux sous-classes:

La sous-classe (a) : qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés.

La sous-classe (b) : qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomey *et al.*, 2002).

Classe II « Les bactériocines peptidiques »:

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes.

- *La sous-classe (a1)* : Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont di-sulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Richard, 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*.

La sous-classe (b1) : Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de la sous-classe (b1) peuvent être distingués:

- le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre.
- le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

La sous-classe (c1) : Comprend toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes (a1) et (b1) (Dortu et Thonart, 2009).

✚ **Classe III « Les bactériocines protéiques » :**

Ce sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques (Nigutova *et al.*, 2007).

✚ **Classe IV « Les bactériocines complexes » :**

Ce sont des peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. (Dortu et Thonart, 2009).

➤ **Mécanisme d'action de bactériocine:**

Le mécanisme d'action des bactériocines est largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes :

- ✚ Fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible : C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité.
- ✚ L'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique: plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore.
- ✚ La formation du pore: Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire. (Champak *et al.*, 2005).

➤ **Les propriétés des bactériocines pour une application en industrie alimentaire :**

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide. Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan *et al.*, 2006).

➤ **Les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire:**

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après production, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses.

D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (Guinane *et al.*, 2005).

La pédiocine, une bactériocine de classe II, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment faits avec la lacticine 3147 (Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007). Au niveau législatif, cette forme ne nécessite pas d'approbation. Cependant, si la culture n'est pas traditionnellement consommée, il faudra se référer à la législation sur les « Novel food » (EC258/97).

II- Les bactéries lactiques

1- Définition et caractères généraux :

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique (Saad, 2010). Ce sont des cellules vivantes, procaryotes organotrophes (C'est-à dire qui requiert des molécules organiques complexes comme source d'énergie), pouvant se présenter en coques ou en bacilles (Badis *et al.*, 2005). Ce sont des bactéries non sporulantes, Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%, aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des pH compris entre 4 et 6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou à pH 3,2 (Joseph, 2003).

Les bactéries lactiques sont pour la plupart mésophiles (se développent à des températures comprises entre 10°C et 45°C) mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. (Salminen *et al.*, 2004; König et Fröhlich, 2009). En général, ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment ni l'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol. (Dellaglio *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 2004).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart.,2009).

2- L'habitat des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels végétaux (Plantes et fruits), animaux et humains (cavités buccales, vaginales et intestinales, fèces et dans le lait) sans provoquer des maladies. Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. (De Roissard et Luquet, 1994 ; König et Fröhlich, 2009).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : Le lait et les fromages (*L. casei subsp. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* et *L. brevis*), dans les laits fermentés (*L. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*L. brevis*, *L. Curvatus*, *L. buchneri* et *L. san francisco*) (Demazeaud et Cogan., 1996).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Bergey's manual., 2009).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages Italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja). (Bekhouche et Boulahrouf , 2005).

3- Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement. Elles sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important (Gevers, 2002).

➤ **Exigences en vitamines :**

Vis-à-vis des vitamines, toutes les espèces de Lactobacilles présentent une exigence absolue pour le pantothénate de calcium (Vitamine B5) et la riboflavine (sauf pour *L.brevis* qui nécessite la thiamine vitamine B1 et l'acide folique), de plus *L.lactis* , *L.bulgaricus* et *L.acidophilus* exigent la cobalamine (vitamine B12), *L.helveticus* exige la pyridoxine (vitamine B6) , *L.casei* la pyridoxine et l'acide folique. Les lactocoques ont une exigence en niacine et en acide pantothénique, les streptocoques thermophiles ont une exigence absolue en acide pantothénique et en riboflavine et leur croissance est stimulée par la thiamine, la niacine, la biotine et la pyridoxine (Luquet et de Roissard, 1994).

➤ **Exigences en sources azotées :**

Chez certaines souches de lactocoques, la production d'acide dans le lait peut être stimulée par le mélange « adénine guanine », l'uracile et la xanthine. Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, cytosine, désoxyguanosine, guanine, thymidine et d'uracile (Law et Kolstad, 1988).

➤ **Influence des cations :**

La supplémentation du lait avec 1 à 2,1 mM (milli-molaire) en ions Mg^{++} permet la stimulation des thermophiles, cet ion serait indispensable pour la croissance de *L.helveticus* et essentielle pour celle de *L.lactis* et *L.delbruckii*.

-Le manganèse à lui aussi des effets biologiques importants chez les bactéries lactiques .Le manganèse est nécessaire à :

- La structure et le fonctionnement des enzymes, dont l'ARN polymérase.
- La détoxification des cellules mises en présence de l'oxygène.

-Le potassium joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire. Cet ion est exigé pour la croissance de *L.helveticus* et *L.casei*.

-Le sodium quant à lui, exerce un effet sélectif sur les différentes espèces de bactéries lactiques. (Luquet et de Roissard, 1994).

4- Les voies fermentaires des bactéries lactiques :

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation des composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène le pyruvate. Dans la respiration, les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott *et al.*, 2003). Sur la base de leurs profils fermentaires (nature et concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose), les bactéries lactiques peuvent être classées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires.

➤ Voie homofermentaire :

Les bactéries lactiques homofermentaires utilisent la voie de la glycolyse pour conduire dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules d'acide lactique et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks., 1994). Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles.

➤ Voie hétéro fermentaire :

En utilisant la voie de 6- phospho-gluconate, Les bactéries lactiques dites hétérofermentaires fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ comme produits finaux. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles. (Thompson et Gentry-Weeks., 1994).

La différence entre ces deux groupes est détectable par dégagement de CO₂. Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP. Certaines bactéries lactiques homos fermentaires dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétéro fermentaires facultatives (Axelsson, 2004).

5- Classification des bactéries lactiques :

Le groupe des bactéries lactiques a été systématique, ensuite plusieurs travaux dans ce domaine ont été repris par (Orla-Jensen 1991 ; Collin *et al.*, 1987 Collin *et al.*,1993 ; Davies et Law,1984 ; Gilliland, 1985 ; Stiles et Hotzapfel, 1997 ; Sneath *et al.*, 1986 ; Leveau et Bouix, 1980 cité dans de Roissart et Luquet ,1994) dont le classement est complété par la classification moderne qui a permis de distinguer les différents genres.

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6,5%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone,... etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich, 2009).

L'identification des espèce de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide d'API système (API50CH) (Curk *et al.*, 1994). L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004).

Selon la dernière édition de systematic bacteriology de Bergey's manual (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de :

➤ Les coques lactiques :

Elles appartiennent à la famille des Streptococcaceae. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation (homo ou hétérofermentaire). Les coques lactiques ont des exigences nutritionnelles parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Stiles et Holzapfel., 1997).

a-Lactococcus : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. Mésophiles, leur température optimale de croissance varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits.

b-Streptococcus : les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9,6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

c-Aerococcus : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), non-gazogènes, arginine (-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

Les genres *Aerococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* ont été anciennement groupés en un seul genre *Streptococcus*. (Bekhouche et Boulahrouf., 2005). Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Parmi le genre *Streptococcus*, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *S. thermophilus*. Selon Guiraud (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc.Lactis subsp. cremoris*, *Lc. Lactis subsp. Lactis* et *Lc. Lactis subsp diacetylactis*

d-Leuconostoc : Ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains Leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les Leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires.

La classification basée sur le GC% a permis de distinguer quatre espèces : *Leuconostoc mesenteroides*, *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. enos* (Leveau et Bouix., 1993).

e-Oenococcus : les cellules sont immobiles, asporulantes, de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

f-Pediococcus : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais des chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudo-catalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et poussent à pH = 5 mais pas à pH = 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (Guiraud., 1998).

i-Vagococcus : les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

g-Tetragenococcus : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires. Leur métabolisme est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose, comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

k-Enterococcus : ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, pH optimum 9,6 ; la croissance à 10 et 45°C et une température optimale de croissance de 35 à 37°C.

l-Weissella : les cellules sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

➤ **Les bacilles lactiques :**

a-Lactobacillus : Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches du genre *Lactobacillus* sont constituées de bacilles longs et fins (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

b-Carnobacterium : ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychro-tolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

6- Intérêts et Rôles des bactéries lactiques :

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'industrie agroalimentaire et de la santé.

➤ **Domaine agro-alimentaire « L'aspect technologique : Les levains » :**

- **Définition des levains :**

Les levains sont généralement des cultures mixtes de souches lactiques et non pas des cultures pures utilisées dans le domaine de l'industrie agroalimentaires pour des fins multiples.

- **Rôles des levains :**

- ✓ **Rôle dans la conservation:**

Les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la bio conservation des différents aliments. L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration et l'augmentation de la durée de conservation des aliments sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009).

✚ La conservation par la production d'acide lactique:

Les bactéries lactiques sont utilisées dans le domaine de l'agriculture comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, et conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. (Khuntia et Chaudhary, 2002; Salawu *et al.*, 2001).

Les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis *et al.*, 2005).

✚ La conservation par la production de bactériocines:

Les bactériocines représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes. (Dortu et Thonart, 2009).

Tableau 4: Les principales bactériocines produites par certaines espèces de bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009).

Dénomination	Espèce productrice
Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Lacticine 481	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Diplococcine	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>
Lactostrepcine (S)	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Lactocidine	<i>Lactococcus fermentum</i>
Lactocine 27	<i>Lactbacillus helveticus</i>
Helveticine	<i>Lactbacillus helveticus</i>
Lactacine B	<i>Lactobacillus acidophilus N2</i>
Lactacine F	<i>Lactobacillus acidophilus SS</i>
Plantaricine A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Pediocine A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

Tableau 5: exemples de bactériocines produites par l'espèce *Lactobacillus plantarum*. (Ouwehand et Vesterlund, 2004)

Bactériocines	Souches productrices
Pédiocine PA-1	<i>L.plantarum</i> WHE92
Plantaricine EF	<i>L.plantarum</i> C11
Plantaricine JK	<i>L.plantarum</i> C11
Plantaricine S	<i>L.plantarum</i>
Plantaricine A	<i>L.plantarum</i> C11

✓ **Rôle sur la structure et la texture:**

Dans les produits laitiers, ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait, la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage (Doguiet, 2010).

✓ **Rôles sur les caractéristiques organoleptiques:**

Par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits synthétisés par les bactéries lactiques tels que le di-acétyle et l'acétaldéhyde, sont responsables des saveurs et des caractéristiques organoleptiques du lait. (Doguiet, 2010). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

➤ **Domaine de la santé « L'aspect médical : Les probiotiques »**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé en 1907 par Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries lactiques. (Lilly et Stillwell, 1965).

L'expression « probiotique » dérive de deux mots grecs ; « pro » et « bios » qui signifient en faveur de la vie, ce sont des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale.

- **Définition des probiotiques :**

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités appropriées ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium brevé*, *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, et *Sc. thermophilus*. *L. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication du yaourt. (Makhloufi., 2012).

- **Rôle des probiotiques :**

- ✓ Les lactobacilles excrètent la bêta-galactosidase, souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilite donc la digestion du lactose. (Larpent, 1997).
- ✓ Certaines souches ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires qui sont alors plus inhibiteurs sur le développement des bactéries pathogènes que les formes conjuguées.
- ✓ Ces souches peuvent inhiber l'implantation des germes pathogènes par compétition.
- ✓ La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité.
- ✓ La production d'acides organiques (acides lactique, acétique), de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines limite le développement des entérobactéries pathogènes.
- ✓ Ces bactéries peuvent réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines, indole) et peuvent ainsi diminuer les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques.
- ✓ Les probiotiques peuvent également produire des métabolites susceptibles de neutraliser « in situ » certaines toxines bactériennes.
- ✓ Les probiotiques peuvent stimuler les cellules immunitaires et favorisent la production d'anticorps qui inhibent ainsi les bactéries pathogènes à la surface des muqueuses intestinales.

- ✓ Les probiotiques participent dans la maturation et le développement du système immunitaire en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défenses contre un agent exogène chez les nourrissons et les personnes âgées. (Yateem *et al.*, 2008).
- ✓ Les probiotiques ont la capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011).
- ✓ Certaines souches peuvent posséder une activité anti-cancérogène dont les propriétés peuvent se répartir en deux catégories :
 - ✚ La prévention de l'initiation d'un cancer, soit en détruisant des substances pré-cancérogènes présentes dans l'organisme, soit en inhibant les bactéries présentes dans le tractus digestif, productrices d'enzymes catalysant la conversion de substances cancérogènes.
 - ✚ La suppression des cellules tumorales, soit directement, soit de façon indirecte, en favorisant l'activité des macrophages qui sont impliquées dans la destruction des cellules tumorales.
- ✓ Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan *et al.*, 2010).
- ✓ Uehara *et al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

- **Applications des probiotiques :**

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et sont déjà commercialisées telles que *Bifidobacterium lactis*. (EX :Danone).

✚ Traitement des diarrhées :

Les souches probiotiques *L. acidophilus* et *L. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner *et al.*, 2005).

✚ Traitements gastriques :

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastroduodénaux. (Reid et Burton, 2002).

Tableau 6: Utilisations commerciales et effets bénéfiques de quelques souches de *Lactobacillus* probiotiques (Prioult, 2003).

Souches	Produits	Effets observés chez l'humain
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (GG)	Yaourts à boire Yaourts Capsules	Prévention des allergies. Traitement des allergies. Diminution des incidences des diarrhées. Diminution des diarrhées à rotavirus.
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (La1) (Lj1)	Yaourts à boire Yaourts	Inhibition du développement d' <i>Helicobacter pylori</i> . Stimulation de l'activité phagocytaire.
<i>Lactobacillus casei</i> (Shirota)	Yaourts à boire Laits fermentés	Augmentation de l'activité des cellules NK. Diminution des diarrhées à rotavirus.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NCFM).	Laits fermentés Yaourts Capsules	Diminution des diarrhées infantiles. Facilite la digestion du lactose.
<i>Lactobacillus plantarum</i> (229v)	Jus de fruits	Prévention des maladies cardio- vasculaires.
<i>Lactobacillus casei</i> (DN- 114 001)	Yaourts à boire	Stimulation de la production d'IgA. Diminution des incidences des diarrhées.

7- Les lactobacilles:

7-1- Caractères généraux :

Ils représentent le groupe le plus important des bactéries lactiques, contenant plus de 120 espèces et 20 sous espèces. Ce nombre évolue régulièrement, treize nouvelles espèces ont été proposées en 2005, neuf en 2006 et sept autres en 2007 (Lee et Salminen, 2009).

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles Gram positif, isolés ou en chaînettes, non sporulés et immobiles avec un pourcentage G+C inférieur à 50%. Ces bactéries sont catalase négatif, micro aéroophile ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique, certaines espèces sont homolactique d'autres hétéro-lactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ à coté de l'acide lactique. Ils sont acidophiles, protéolytiques et peu lipolytiques. (Joseph, 2003).

Tableau 7: Caractéristiques des lactobacilles (Joseph, 2003)

Groupe	Bétabacterium						Streptobacterium						Thermobacterium					
	<i>L.brevis</i>	<i>L.buchneri</i>	<i>L.cellobiosus</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>L.fructivorans</i>	<i>L.hilgardii</i>	<i>L.kefir</i>	<i>L.casei casei</i>	<i>L.casei pseudoplantarum</i>	<i>L.casei rhamnosus</i>	<i>L.casei tolerans</i>	<i>L.casei curvatus</i>	<i>L.plantarum</i>	<i>L.sake</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.delbrueckii bulgaricus</i>	<i>L.delbrueckii lactis</i>	<i>L.helveticus</i>
CO ₂ à partir du glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 15°C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Culture à 45°C	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	V	.	+	+	+	+	+
Arginine (NH ₃)	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	V	.	.
Arabinose	V	V	V	V	V	V	V	+	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-
Gluconate	V	V	V	+	-	V	V	V	+	+	V	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	V	+	-	-	-	-	+
Mannitol	V	V	+	+	-	V	-	-	-	-	-	+	-	V	-	-	-	+
Raffinose	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Ribose	V	V	+	+	V	V	-	+	+	+	V	+	+	+	-	+	-	+
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-
Xylose	.	.	F	F	.	.	.	B	.	-
Sérotype	F	R	-	-	.	.	R	P	.	P	.	.	.	R	R	R	R	R
Auxotrophie														F	B	B	P	F

R : Riboflavine ; V : Variable ; P : Pyridoxal ; F : Acide folique ; B : Vitamine B12 ; (.) : Non déterminé.

7-2- Classification des lactobacilles :

Les lactobacilles appartiennent au groupe des *Firmicules*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae*. (Prescott *et al*, 2010). Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel:

- Groupe « *Thermobactérium* » il comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C les espèces les plus fréquents dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *L.helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L.delbrueckii*, ect.
- Groupe «*Streptobactérium* » il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15°C. Il comporte les espèces *L. casei* qui est le lactobacille prédominant du lait *L.curvaius*, *L. planlarum*, *L.sake*.
- Groupe «*Betabactérium* » il comprend les lactobacilles hétérofermentaires les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont : *L. brevis*, *J. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L.fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. kéfir*. (Joseph, 2003)



Figure 2: Aspect morphologique de *Lactobacillus acidophilus* (A), *Lactobacillus helveticus* (B), *Lactobacillus plantarum* (C) et *Lactobacillus casei* (D) observées au microscope électronique (G×1250) (Kandler *et al.*, 1986)

Tableau 8: Distinction des lactobacilles homofermentaires :

Sous-genre	Culture à 45°C	Culture à 15°C
<i>Thermobacterium</i>	+	-
<i>Streptobacterium</i>	-	+

(Source : Pilet *et al.*, 1998)**Tableau 9:** Critères différentiels des trois groupes de *Lactobacillus* (Larpent, 1997)

	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Bétabacterium</i>
ADH	-	+/-	+
Glucose (Gaz)	-	-	+
Glucosides	+/-	+	-
Gluconates (Gaz)	-	+	+
Aldolase	+	+	-
Pentoses	-	+/-	+/-
Thiamines	-	-	+
Acide lactique	DL ou L	D ou DL	DL
G+C (%)	34.7 -50.8	33 – 46.4	35 -53.4

7-3- Habitat des lactobacilles:

Les lactobacilles sont isolés de diverses niches écologiques telles que les plantes, le sol, l'eau, les produits laitiers ou les végétaux fermentés ou en décomposition. Les lactobacilles sont des habitants naturels des tractus gastro-intestinaux et uro-génitaux de l'homme et de l'animal. (Saad, 2010).

7-4- Rôle des lactobacilles :

Étant donné la diversité des propriétés métaboliques présentées par les membres du genre *Lactobacillus*, ces bactéries ont été trouvées dans un certain nombre de produits alimentaires fermentés. Dans ces produits, les lactobacilles contribuent principalement à leur conservation et leur saveur de nutrition. Ces souches sont ajoutées en tant que démarreurs délibérés ou participent à la fermentation en raison de leur présence en tant que contaminants naturels des substrats.

Une autre propriété des lactobacilles qui est devenue plus appréciée est leur capacité de produire des bactériocines. Les bactériocines ont probablement évolué pour fournir à la souche productrice un avantage sélectif dans une place microbienne complexe.

Beaucoup d'attention a été orientée sur leur rôle potentiel comme probiotiques. Les souches qui ont été examinées pour leurs effets probiotiques. Les effets cliniques rapportés et attribués à la consommation de *Lactobacillus* se composent de l'amélioration de l'immunité, d'une diminution de l'activité enzymatique fécale, empêchant des désordres intestinaux et réduisant la diarrhée virale. (Givry, 2006)

Tableau 10: Principales espèces et sous espèces de lactobacilles utilisées en industrie laitière (Kandler *et al.*, 1986).

Espèces	Fermentation du glucose	Croissance		Groupe
		15°C	45°C	
<i>L.helveticus</i>	Homofermentaires	-	+	Thermophiles
<i>L.delbruckii</i>		-	+	
<i>subsp.bulgaricus</i>		-	+	
<i>L.delbruckii</i>		-	+	
<i>subsp.lactis</i>		-	+	
<i>L.acidophilus</i>	Hétérofermentaires	-	+	Mésophiles
<i>L.casei</i>		+	-	
<i>L.plantarum</i>		+	-	
<i>L.kefir</i>		+	-	
<i>L.brevis</i>		+	-	
<i>L.fermentum</i>		-	+	Thermophiles

Tableau 11: Rôle de quelques espèces de *Lactobacillus* utilisés en industrie. (Lamontagne *et al.*, 2002)

Espèce	Emploi en industrie	Rôle
<i>L.bulgaricus</i>	Yaourt – Fromages (Mozzarella)	Acidification en cours de production, protéolyse en cours de maturation, libération du glucose pour le brunissement, production d'arômes et du polysaccharide (Yaourt).
<i>L.helveticus</i>	Fromages (Suisse, Mozzarella...)	Acidification en cours de production, prévention de l'amertume (peptidase).
<i>L.casei</i>	Yaourt –fromage (Cheddar...)	Un peu d'acidification en cours de production, contribution au caractère probiotique.
<i>L.acidophilus</i>	Yaourt- lait acidophile	Acidification en cours de production, contribution au caractère probiotique.
<i>L.kefir</i>	Kéfir	Acidification en cours de production

III- Les contaminants pathogènes du lait

Les bactéries pathogènes contaminent de nombreux produits alimentaires et peuvent constituer un véritable danger pour leur qualité et leur conservation. Plusieurs espèces présentent un grand danger d'un point de vue sanitaires (Joseph, 2003). La plupart des micro-organismes pathogènes sont ubiquitaires et peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires, intoxications et d'autres maladies infectieuses d'origine alimentaire (Isaac, 2009).

1- Les bactéries pathogènes du lait :

Les bactéries pathogènes sont responsables des affections reliées à la santé des manipulateurs et des consommateurs. On retrouve deux genres de bactéries pathogènes : les bactéries infectieuses et les bactéries toxigènes.

Les bactéries infectieuses :

Qui doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir. Une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif, apparaissant alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête et même la mort, dans certains cas extrêmes. Il s'agit de *Salmonella sp.*, *E.coli 0157 :H7*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Brucella* et *Campylobacter sp.* (Lamontagne *et al.*, 2002).

Les bactéries toxigènes :

Qui produisent une toxine dans l'aliment et c'est cette toxine qui rend le consommateur malade. Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, tels que la pasteurisation et même la stérilisation, dans certains cas. Il s'agit de *Staphylococcus sp.*, et *Clostridium botulinum* (Lamontagne *et al.*, 2002).

2- Présentation de quelques contaminants pathogènes du lait responsables des toxi-infections et intoxications alimentaires :

2-1- *Staphylococcus aureus* :

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des staphylococcaceae. Les staphylocoques étaient connus comme agents causant des inflammations de la peau. Ils ne sont associés aux intoxications alimentaires qu'en 1884. (Elliot, 2001).

Sous microscope, l'espèce *S. aureus* est une bactérie Gram positif, de 1µm de diamètre, les cellules apparaissent groupées en grappe de raisin. Cette espèce est aéro-anaérobie facultative mais croit mieux en anaérobiose, immobile et non sporulée. Elle est halotolérante (supporte 10-15% de NaCl), oxydase négative (Vernozy- Rozand ,1997 ; Bhunia, 2008), nitrate réductase (+) et fermente le glucose et le mannitol (Prescott *et al*, 2010).

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).

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont très ubiquitaires, elles sont présentes sur la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud et des humains, l'air et l'eau. Elles font partie des communautés microbiennes des laits, des produits fermentés, des fromages et des produits de salaison. (Prescott *et al*, 2010).

➤ L'origine des contaminations par *S.aureus* :

La maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus* est un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières du lait cru. La contamination du lait cru par *Staphylococcus aureus* peut être due à :

- ✓ Un contact du lait avec des porteurs sains (gorge et voies nasales).
- ✓ Un contact avec une personne symptomatique (furuncles et plaies suppurantes).
- ✓ mammites (Inflammation de la mamelle d'origine bactérienne). (Lamontagne *et al*., 2002).

➤ **Pouvoir pathogène :**

S. aureus est à l'origine de toxi-infections alimentaires car c'est une bactérie toxigène qui produit des toxines thermorésistantes dans les aliments comme le lait cru. Smith et Palumbo (1983) ont montré que bien que *Staphylococcus aureus* soit détruit par le biais de la pasteurisation, les entérotoxines produites pouvaient supporter la pasteurisation et causer ainsi l'intoxication. Cette bactérie est considérée donc comme bactérie potentiellement pathogène. (Poumeyrol et Lafarge, 1997).

S. aureus peut être responsable après ingestion des troubles digestifs chez l'homme. C'est pourquoi le dénombrement de *S. aureus* dans les aliments a été pratiqué depuis longtemps. Cette espèce constitue l'agent principal causant les mammites bovines et caprines et pose donc un problème de santé pour l'homme. Valle *et al.*, 1990 ont rapporté que 48.8% des souches de *S. aureus* isolées du lait de chèvre étaient toxigènes. Des intoxications staphylococciques ont été attribuées au lait cru, au lait en poudre et aux fromages.

Seuls les staphylocoques à coagulase positif sont considérés comme pathogènes. Trois espèces peuvent coaguler le plasma du lapin oxalaté : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus byicius*. (Leyral et Vierling, 2007). Le staphylocoque doré *Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries pathogènes les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier. Ses infections peuvent être mortelles, si la souche est résistante aux antibiotique (la méthicilline et à la vancomycine) (Joseph; 2003).

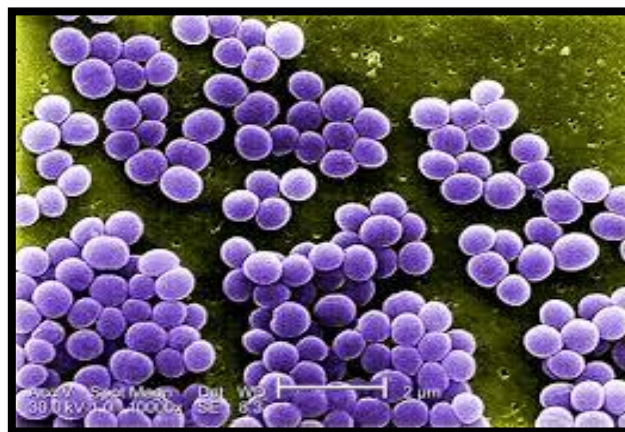


Figure 3: Aspect morphologique de la souche *Staphylococcus aureus* observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007)

2-2- *Escherichia coli* :

Escherichia coli appartient à la famille des Entérobacteriaceae, ce sont des bacilles ou coccobacilles Gram négative, oxydase négative, catalase positive, asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites, ils fermentent le glucose, ils sont anaérobies facultatifs. (Goubau et Pellegrims, 2000).

Ils se multiplient facilement sur milieu ordinaire à pH neutre à une température de 37 °C. Ce sont des contaminants alimentaires très fréquents (la présence d'*Escherichia coli* dans les eaux et les aliments est le témoin d'une contamination fécale directe ou indirecte). C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, très abondant dans les matières fécales (Joseph; 2003).

➤ Le pouvoir pathogène :

Les souches d'*Escherichia coli* sont rarement pathogènes, à l'exception de certaines souches qui sont responsables d'intoxications et de toxi-infections à cause d'un développement abondant et causent des diarrhées dans les pays en voie de développement, où elles touchent surtout les enfants (Nauciel et Vildé, 2005).

E. coli est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales, initialement sensibles à beaucoup d'antibiotiques, elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et Vildé, 2005).

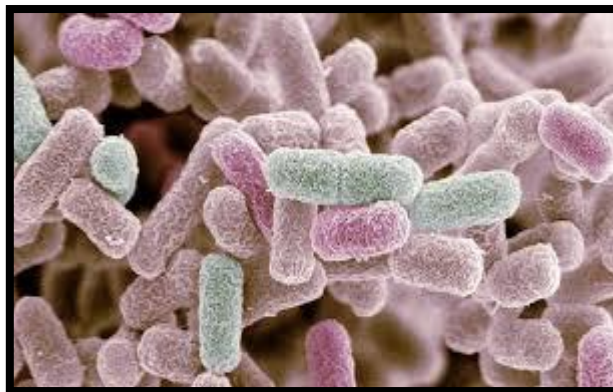


Figure 4 : Observation au microscope électronique de *Escherichia coli* (Goubau et Pellegrims, 2000)

2-3- *Salmonella*:

Les salmonelles appartiennent à la famille des Entérobacteriaceae .Ce sont des bactéries Gram négatif, anaérobies facultatives, capables de se multiplier à des températures comprises entre 5et 45°C et des valeurs de pH de 4,5 à 9. (Alomar, 2008).

➤ **Pouvoir pathogène :**

Les salmonella sont à l'origine de Salmonellose qui est l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues (Alomar *et al.*, 2008). La salmonellose (gastro-entérite à *Salmonella*) est causée par plus de 2000 sérovars de *Salmonella*, provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales, diarrhées, qui durent de quelques jours à quelques semaines. La salmonellose la plus fréquente est due à *salmonella typhimurium* (Prescott *et al.*, 2003). Elle est rencontrée dans tous les pays et isolée chez l'homme, les animaux et dans l'environnement, elle occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (Avril *et al.*, 1992).

➤ **Mode de transmission :**

Salmonella typhi et *Salmonella paratyphi* infectent essentiellement l'homme et la transmission se fait au contact des malades atteints de la fièvre typhoïde ou des porteurs chroniques asymptomatiques ou par l'ingestion d'eau ou d'aliments souillés par les excréments des malades. La mortalité est élevée à cause du développement de résistances aux antibiotiques par les bactéries. (Rampal *et al.*, 2000). Les salmonelles non typhiques comme *Salmonella Enteritidis* ou *Salmonella typhimurium* sont largement disséminés dans la nature et sont associés à un réservoir animal. La contamination se fait essentiellement par des aliments mal conservés ou infectés à partir de réservoirs d'animaux.

Tableau 12: Aliments suspectés et agents responsables (Rampal *et al.*, 2000).

Aliments	<i>S.Enteritidis</i>	Autres salmonelles
Lait et produits laitiers	6.3%	4.4%
Œufs et ovo produits	56.6%	30.4%
Viandes et volailles	3.4%	18.5%
Poissons et fruits de mer	2.9%	7.6%
Autres aliments	16%	8.7%



Figure 5: Observation au microscope électronique de *Salmonella Enteritidis* (Gx10000)
(Prescott *et al.*, 2003)

2-4- Bacillus :

Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets Gram positif, généralement mobiles.

➤ **Pouvoir pathogène :**

En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé. En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces du genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxi-infections alimentaires ou, plus rarement, d'infections opportunistes. *Bacillus cereus* est le principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* peuvent également être mises en cause. Deux aspects cliniques différents peuvent être observés :

- ✓ La première forme, la période d'incubation est de 8 à 16 h et le symptôme principal ou exclusif est une diarrhée persistante de 12 à 14 h. Les symptômes diarrhéiques sont liés à la sécrétion d'une entérotoxine, constituée de plusieurs composés protéiques agissant probablement en synergie. (Gaillard, 1989). De nombreux aliments peuvent être à l'origine de tel syndrome : Viandes, légumes sauces...etc.
- ✓ La seconde forme, la période d'incubation n'est que de 1 à 5 heures et les vomissements, cédant en 6 à 24 heures, sont au premier plan. Les intoxications alimentaires provoquées par les bactéries du genre *Bacillus* ne s'accompagnent pas de fièvre. L'évolution est toujours bénigne et ne nécessite le plus souvent aucun traitement particulier.



Figure 6: Aspect morphologique de la souche *Bacillus subtilis* observée au microscope électronique (Bridier *et al.*, 2011)

2-5- *Pseudomonas aeruginosa* :

Ce sont des bacilles fins, dans la plupart du temps isolés ou en diplobacilles, Gram négative, saprophytes, oxydase positive ou négative, aérobies, généralement droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire. Ils se multiplient bien sur milieu ordinaires étant mésophiles ou psychrophiles (20 à 30°C) (Joseph; 2003).

➤ Pouvoir pathogène :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire, vivant dans les sols et dans les milieux humides. Elle fait partie des germes couramment recherchés lorsque l'on procède à une analyse microbiologique d'un échantillon d'eau. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante aux bactéries Gram (-), elle est souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés).

Pseudomonas aeruginosa est exceptionnellement l'agent de gastro-entérites (Vomissements, diarrhées, crampes abdominales) à partir d'aliments contaminés par des lésions cutanées ou plus rarement des fèces et elle est généralement rencontrée dans l'eau conditionnée. Il peut être à l'origine d'autres formes de pathologie notamment : des infections de l'œil, infections urinaires, infections gastro-intestinales et des méningites. Elle possède au moins six toxines (Joseph; 2003).

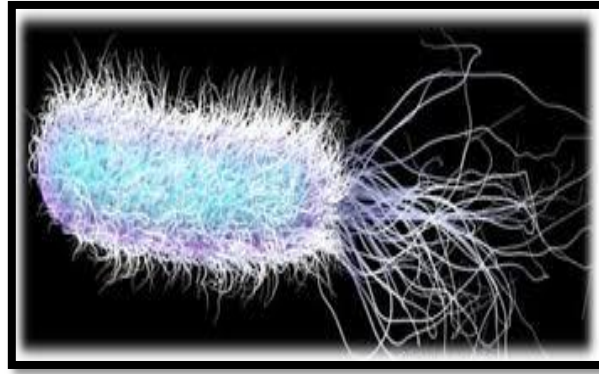


Figure7: Observation au microscope électronique de *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009)

2-6- *Shigella flexnerii* :

Shigella flexnerii est une bactérie Gram (-) du genre *Shigella*. Elles sont membres de la famille des Enterobacteriaceae, à savoir; *Shigella dysenteriae* , *Shigella Flexnerii* ,*Shigella boydii* et *Shigella sonnei*. Les espèces de *Shigella* sont Transmises par ingestion d'aliments contaminés, d'eau ou par contact direct personne à personne (Sack *et al.*, 1997).

➤ **Pouvoir pathogène :**

Elles sont responsables des shigelloses (infections intestinales spécifiquement humaines), qui sont des dysenteries bacillaires transmises par l'eau de boisson et les aliments souillés par les selles des malades ou porteurs chroniques. Il s'agit d'infections intestinales localisées essentiellement au gros intestin où les germes se multiplient en provoquant une inflammation de la muqueuse se traduisant par une diarrhée glaireuse et sanguinolente et de déshydratation. *Shigella flexnerii* est l'espèce la plus fréquente, isolée dans 70 % des cas. Elle est généralement la cause d'entérites bénignes qui touchent particulièrement les enfants et parfois de petites épidémies de crèches ou d'écoles (Clark et Maurelli, 2007).

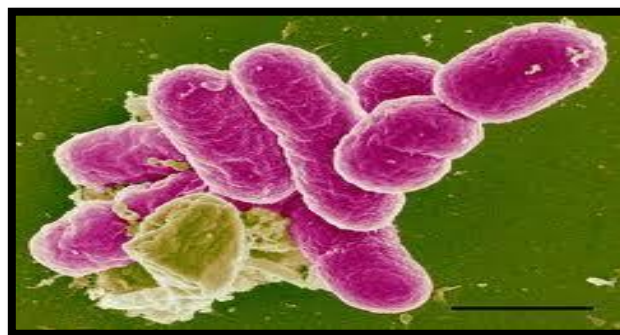


Figure 8: Observation au microscope électronique de *S. flexnerii* (Clark et Maurelli, 2007)

IV- Les interactions microbiennes

Chaque écosystème est composé d'une grande diversité de micro-organismes. La complexité de l'écosystème est fortement liée à cette diversité, ainsi qu'aux interactions microbiennes qui en résultent.

L'importance des interactions microbiennes a été mise en évidence lors de la fabrication de plusieurs produits alimentaires (vin, fromage, yaourt). Dans les produits laitiers, l'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments influencent fortement le développement des micro-organismes. Ainsi, tout au long du processus on observe une dynamique particulière à chaque population. Certains micro-organismes se multiplient activement tandis que d'autres tendent à disparaître. (Bonaïti *et al.*, 2005).

De ce fait les scientifiques exploitent les interactions microbiennes pour assurer la salubrité des aliments et pour lutter contre les microorganismes indésirables.

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres micro-organismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités.

On peut classer les interactions microbiennes en deux grandes catégories : les interactions positives et les interactions négatives.

1- Les interactions positives :

➤ Le commensalisme:

On parle de commensalisme lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance essentielle et/ou par la destruction d'un facteur inhibiteur de sa croissance par une autre population. (Cholet, 2006).

Le commensalisme (du latin *cum*, avec et *inensa*, table) est une relation dans laquelle le commensal tire un avantage alors que l'autre n'est ni affecté, ni aidé, il s'agit d'un processus unidirectionnel. Souvent, l'hôte et le commensal (Prescotte *et al*, 2010).

Les bactéries lactiques sont capables d'excréter des métabolites servant de substrats aux bactéries de surface contribuant au développement de la flore bactérienne (Cholet, 2006). Dans les fromages à pâte pressée cuite, les bactéries propioniques se développent grâce à l'utilisation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (Siewewerts *et al.*, 2008).

➤ Le mutualisme ou la proto-coopération :

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (Protocoopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre.

Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement. Ces interactions sont bénéfiques aux deux populations partenaires. (Cholet, 2006).

Le meilleur exemple sur la protocoopération est l'interaction entre les deux espèces : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbruckii* dans la fabrication du yaourt. Au début de la fermentation, c'est streptocoque qui se développe le plus rapidement et produit différents acides (acide pyruvique, acide formique, acide lactique), l'adénine et une très faible quantité de CO₂. L'abaissement progressif du pH et la présence de ces substances vont petit à

petit activer la croissance du Lactobacille qui est plus acidophile. Celui-ci a une activité protéolytique plus importante que celle du streptocoque et la libération d'acides aminés (Valine, Histidine, glycine, acide glutamique, leucine, méthionine) et des peptides vont les stimuler. Malheureusement pour le streptocoque, ces interactions positives ne durent pas très longtemps, dans la mesure où il est beaucoup plus sensible au pH bas que le lactobacille. Sa croissance va être progressivement inhibée par l'acidité du milieu. (Siewewerts *et al.*, 2008).

2- Les interactions négatives :

Les interactions négatives sont des réactions d'inhibition faisant intervenir la production des substances antimicrobiennes. Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux.

➤ L'antagonisme ou l'amensalisme ou l'inhibition:

Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'antagonisme ou amensalisme. (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008).

On parle d'antagonisme ou d'amensalisme lorsque la croissance d'un micro-organisme inhibe celle des autres. Cette inhibition résulte en général de la production de certains métabolites tels que le lactate, l'acétate et certains agents antimicrobiens (bactériocines) (Siewewerts *et al.*, 2008).

Les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Ils fermentent les glucides en acides lactique d'où une diminution du pH favorable à la bio-conservation des denrées alimentaires. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi de la production de H₂O₂ (le peroxyde d'hydrogène) et des bactériocines limitant la croissance de certains germes pathogènes. Pour cela, de nombreux produits sont développés, notamment dans le secteur laitier, il est montré que certaines souches de bactéries lactiques peuvent jouer un rôle bénéfique pour la santé humaine (Klaenhammer, 1988, Jack *et al.*, 1995, Sandholm *et al.*, 1999, Tabak, 2007).

Exemple : La bio-préservation

La bio-préservation est l'utilisation des micro-organismes naturels ou contrôlés ou antimicrobiens comme un moyen de conservation des aliments et de prolonger sa durée de vie. (Ananou *et al.*, 2007).

Les bactéries bénéfiques ou les produits de fermentation synthétisés par ces bactéries sont utilisés dans la bio préservation pour contrôler la détérioration et rendre inactifs les agents pathogènes dans les aliments (Joseph, 2003). Les bactéries lactiques ont un intérêt particulier, car elles ont des propriétés antagonistes qui les rendent particulièrement utiles en tant qu'agents de conservation biologiques. Leurs métabolites incluent souvent des substances inhibitrices actives comme l'acide lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et les peptides. Certaines bactéries lactiques produisent la nisine antimicrobienne qui est un conservateur particulièrement efficace. (Joseph, 2003).

➤ La compétition:

La compétition s'installe lorsque différents microorganismes d'une population ou d'une communauté cherchent à s'approprier une même ressource, qu'il s'agisse d'occuper un endroit physique ou de consommer un aliment limitant particulier. (Prescott *et al.*, 2010)

Par exemple dans les produits laitiers, les acides aminés sont essentiellement sous forme de caséines. L'accessibilité à la source d'azote est donc souvent limitante, et les micro-organismes se retrouvent en compétition pour la faible fraction d'acides aminés et de peptides libres (Siewverts *et al.*, 2008).



Matériel
et
Méthodes

I- Matériel biologique :

❖ Provenance des échantillons :

Les prélèvements du lait ont été effectués sur une chamelle *Camelus dromedarius*, âgée de 6 ans ayant une première gestation et une mise bas, vivant en extensif dans la région de Ouargla (sud Algérien). Cette chamelle appartient à la population « Ouled Sidi Cheikh ».








Figure 9 : Une chamelle laitière *Camelus dromedarius* de la population Ouled Sidi Cheikh.

Le système d'élevage pratiqué majoritairement, est de type extensif. L'alimentation de ces chamelles se fait exclusivement dans les pâturages sahariens naturels de cette région, et qui recouvrent 112 espèces divisées en deux catégories dont :

- 88 éphémères, appelées encore "achebs", n'apparaissant qu'après la période des pluies et effectuant tout leur cycle végétatif avant que le sol ne soit desséché. La longueur de ce cycle est très variable d'une espèce à une autre et dure généralement de un à quatre mois (Chehma, 2005).
- 24 permanentes ou vivacées, ont la capacité de survivre en vie ralentie durant de longues périodes et sont dotées de mécanismes d'adsorption racinaire et de rétention d'eau performants (Faye, 1997). Elles constituent les seuls parcours camelins toujours disponibles même en été (Longo et *al.*, 1988) (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Quelques espèces les plus broutées par le dromadaire dans la wilaya d'Ouargla :

	Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	Image	Caractéristiques
Espèce vivaces	Chénopodiacées	<i>Traganum nudatum</i>	Damrane		Arbuste persistant et halophyte. Broutée sèche ou verte et très appréciée par les dromadaires.
	Ephedracées	<i>Ephedra alata</i>	Alanda		Très riche et très appréciée par les dromadaires.
	Poacées	<i>Aristida pungens</i>	Drinn		Résistante à la sécheresse et constitue un pâturage essentiel pour les dromadaires
Espèces éphémères	Brassicacées	<i>Savignya longistyla</i>	Gouglène		Plante annuelle, très abondante dans tous le Sahara septentrional.
	Rosacées	<i>Neurada procumbens</i>	Saadane		Constitue pour les animaux une des meilleurs pâturages donne une bonne remontée de lait, elle très riche en eau.

1- Les échantillons du lait camelin :

Nous avons utilisé dans cette étude un mélange de trois échantillons du lait camelin (**Tableau 14**).

Tableau 14: Échantillons du lait de chamelle collectés.

Échantillons	Date de prélèvement
1	10 mars 2014
2	12 mars 2014
3	14 mars 2014

La traite a eu lieu le matin avant la sortie du troupeau au pâturage. Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute sorte de contamination, dans des flacons stériles de 50 mL, puis amenés au laboratoire dans une glacière. Cette collecte servie à la fois à des tests préliminaires consistant en la mesure du pH, la densité et de l'acidité titrable. Ainsi à une étude microbiologique.

L'enrichissement du lait de chamelle collecté a été réalisé en incubant les échantillons à 30°C pendant 24h. (Badis *et al.*, 2004).

2- Les souches pathogènes utilisées :

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle a été testée sur la croissance de six souches pathogènes d'importance particulière en produits laitiers :

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538),
- *Escherichia coli* (ATCC 4157),
- *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633),
- *Shigella flexnerii* (ATCC 29903)

Ces bactéries sont des souches de références de la collection du laboratoire de microbiologie de l'institut Pasteur d'Alger, le laboratoire de microbiologie du Groupe Sidal d'Alger, et le centre Pierre et Marie Curie (C.P.M.C) de l'hôpital universitaire Mustapha Pacha d'Alger.

II- Méthodes :

Les différentes étapes de la méthodologie suivie dans cette étude sont schématisées dans la figure ci-dessous (Figure 10) :

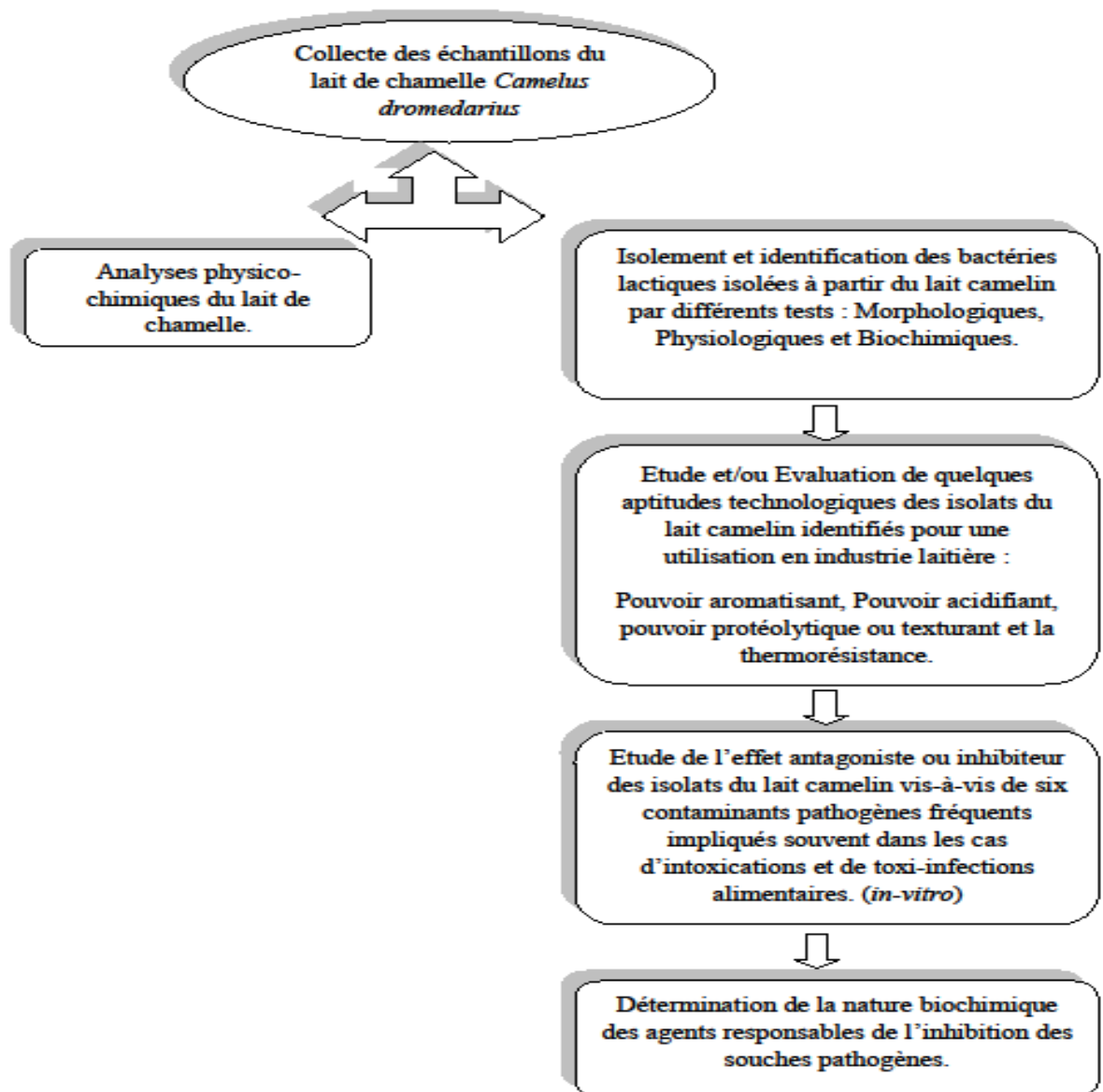


Figure 10 : Procédure expérimentale

1- Analyses physicochimiques du lait camelin:

➤ Le pH :

Dès l'arrivée des échantillons du lait cru de chamelle au laboratoire, le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné (au pH 4 et 7) en trempant les électrodes de ce dernier dans un petit Bécher contenant un petit volume du lait dont la température est à 20°C. La valeur du pH est celle indiquée sur l'écran du pH-mètre.

➤ L'acidité Dornic :

L'acidité Dornic a été mesurée selon la méthode de (Accolas et *al.*, 1977) par titrage avec la soude caustique NaOH 1N d'un échantillon de 10 mL du lait camelin en présence de quelques gouttes d'indicateur coloré « La phénophtaléine » jusqu'au premier virage vers le rose. L'acidité est exprimée en degrés Dornic, sachant que 1°D= 0,1g d'acide lactique dans 1L de lait.

$$\text{Acidité titrable} = V_{\text{NaOH}} \times 100$$

➤ La densité :

La densité a été mesurée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre. L'échantillon du lait camelin est versé dans une éprouvette cylindrique jusqu'au niveau permettant d'assurer le débordement ultérieur du liquide. Le thermo-lactodensimètre est ensuite plongé doucement dans l'éprouvette. La lecture de la valeur de la densité a été faite directement sur les graduations de l'instrument. Une fois la lecture est faite, le thermo-lactodensimètre est rapidement retiré pour lire la température. La densité est corrigée (ramenée à 20°C) en appliquant la formule suivante :

$$\text{Densité corrigée} = \text{densité lue} \pm 0,2 \times (\text{degrés Celsius au-dessus ou en dessous de } 20^{\circ}\text{C})$$

➤ La teneur en matière grasse :

Elle est déterminée par la méthode acido-butyrométrique de Gerber. Les protéines du lait sont dissoutes par l'acide sulfurique, les matières grasses, résistantes à l'action de l'acide sulfurique concentré sont séparées par centrifugation, à chaud en présence d'alcool isoamylique (3-méthyl-1-butanol) qui facilite la séparation. La lecture se fait directement sur les graduations du butyromètre de Gerber et le résultat est exprimé en g/L du lait.

2- Isolement et identification des bactéries lactiques issues du lait de chamelle :

2-1- Préparation des dilutions décimales :

Des dilutions décimales sériées allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été effectuées en prélevant 1 mL de la solution mère (mélange des trois prélèvements du lait camelin) qui a été ajouté à 9 mL de diluant (Tryptone-Sel-Eau) TSE.

2-2- Isolement des souches lactiques :

L'isolement a été réalisé sur milieu (Man, Rogosa, Sharpe) MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. L'ensemencement a été réalisé en profondeur. Après solidification des milieux, les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 48-72 h à 30°C en anaérobiose (**Tableau 15**).

Tableau 15: Milieu utilisé et conditions d'incubation pour l'isolement des lactobacilles mésophiles. (De Man *et al.*, 1960)

Microorganismes	Milieu d'isolement	T°C	Durée (H)	Incubation
Lactobacilles mésophiles	MRS (Man, Rogosa, Sharpe)	30	48-72	Anaérobiose

Le but de l'isolement est d'avoir une collection de micro-organismes identiques en vue de leur identification.

2-3- Purification des souches:

Consiste à réaliser des repiquages successifs sur la gélose MRS avec incubation à 30°C pendant 48h jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, forme, couleur, renseignant sur la pureté de la souche. (Idoui *et al.*, 2009).

2-4- Conservation des souches:

➤ Conservation à court terme :

La conservation à court terme des isolats purifiés est effectuée par ensemencement des souches pures sur gélose MRS inclinée à l'aide d'une anse en platine stérile. Après incubation à 30°C pendant 18h, Les tubes sont maintenus à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les trois à quatre semaines (Saidi *et al.*, 2002).

➤ **Conservation à long terme :**

A partir des jeunes cultures de 18 h sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tr / min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (lait écrémé 70% et 30% de glycérol) sur le culot. Les cultures sont conservées en « Eppendorfs » à - 20 °C. La figure 12 montre le protocole de conservation à longue durée (Badis *et al.*, 2004). Les cultures peuvent être conservées plusieurs mois.

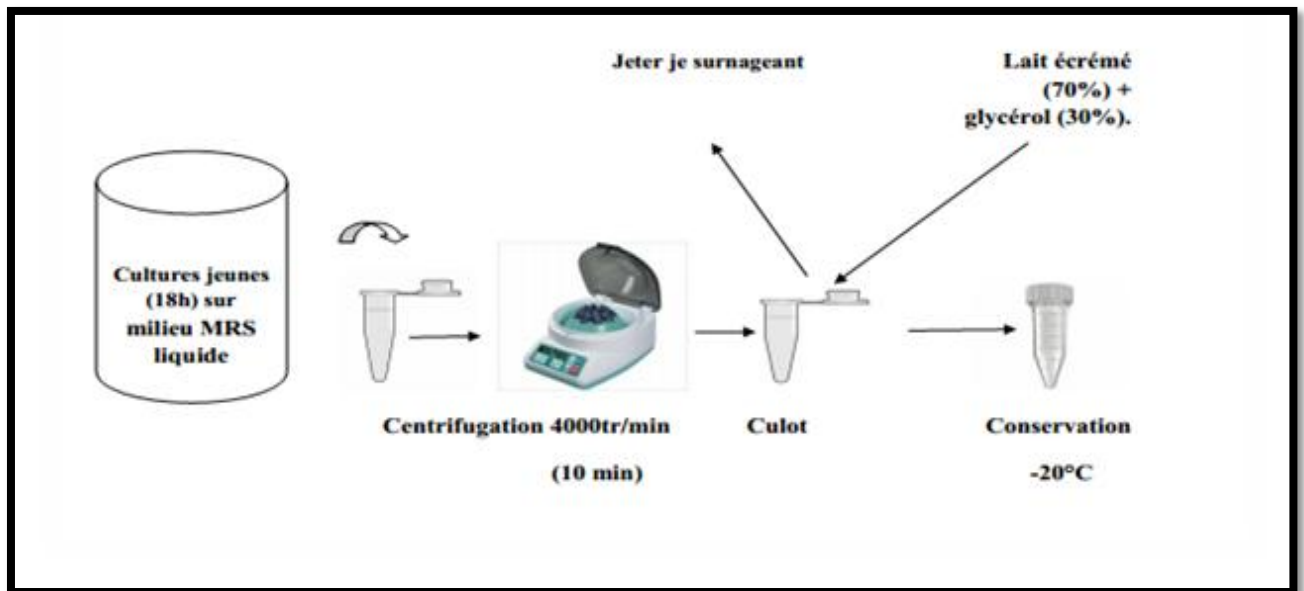


Figure 11: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.

2-5- Identification des souches lactiques isolées:

L'identification des souches a été réalisée par l'application d'un certain nombre de techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche de certains caractères morphologiques (aspect de la colonie sur gélose MRS), microscopiques (Coloration de Gram, forme, mobilité, sporulation), physiologiques (Le test de catalase, la croissance à différentes températures, la croissance à différentes concentrations (%) en NaCl, la production de CO₂) et les caractères biochimiques (La fermentation des sucres détectée par les galeries API50 CH). Toutes les techniques d'identification ont été décrites par (Larpent, 1997, Idoui et Karam, 2008 et Gusils *et al.*, 2010).

2-5-1- Critères morphologiques :

➤ Examen macroscopique :

Une observation macroscopique (à l'œil nu) permet de décrire l'aspect des colonies sur la gélose MRS à savoir la taille, la couleur, la forme, la texture, le contour et la viscosité.

➤ Examen microscopique :

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats purifiés ont été soumis à la coloration de Gram qui a été effectuée selon le protocole décrit par Prescott *et al* (2003).

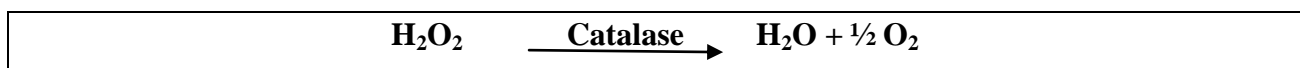
La coloration de Gram (**Annexe II**) permet de différencier les bactéries selon leur Gram en bactéries Gram positif et d'autres Gram négatif et selon leur morphologie cellulaire en bâtonnets ou coques et selon leur mode de regroupement ou d'association (Joffin et Leyral, 1996).

2-5-2- Critères physiologiques :

➤ Test de catalase :

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase qui est une enzyme produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit le peroxyde d'hydrogène et libère l'oxygène (Delarras, 2007).

Pour mettre en évidence cette enzyme une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Les bactéries présentant une réaction positive à la coloration de Gram (Gram positif) et dénuées d'activité catalase (catalase négative) sont présumées des bactéries lactiques et elles sont retenues pour être identifiées ultérieurement (Zadi-Karam et Karam, 2006).

➤ Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau *et al.*, 1991).

Deux tubes de bouillon MRS ont été ensemencés par les isolats du lait de chamelle puis incubés, l'un à 45°C, pendant une période de 24 à 48 heures, l'autre à 15°C durant 1 à 2 semaines (Carr *et al.*, 2002). Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

Les bactéries mésophiles poussent à 15°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

➤ **Croissance en présence de différentes concentrations (%) de NaCl :**

Un milieu MRS à 6,5% de NaCl (6,5g de NaCl par 100mL du milieu MRS liquide) est ensemencé puis incubé à 30°C pendant 2 à 3 jours. Des concentrations plus faibles en NaCl peuvent être ainsi testées (2% ,4% et 8%) (Carr *et al.*, 2002 et Mathara *et al.*, 2004).

On apprécie la croissance par l'apparition d'un trouble.

➤ **Recherche de type fermentaire :**

Les souches sont ensemencées dans un bouillon MRS contenant les cloches de Durham, puis incubées à 30°C pendant 24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire (Hariri *et al.*, 2009).

2-5-3- Critères biochimiques :

➤ **Hydrolyse de l'arginine (Recherche de l'arginine déshydrogénase ADH) :**

✓ **Méthode 1 :**

Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine, la réalisation de ce test se fait par la manière suivante :

A l'aide d'une pipette Pasteur, on inocule la cupule de l'API20 E contenant l'arginine déshydratée avec l'inoculum de la bactérie à identifier (préparé à partir d'une culture de 18 à 24h avec de l'eau physiologique). On ajoute quelques gouttes d'huile de paraffine stérile, on incube à 37°C pendant 24 à 48h. Après l'incubation on lit la réaction obtenue :

✚ Réaction positive : Si le milieu demeure rose.

✚ Réaction négative : Si le milieu devient jaune orangé (Joffin et Leyral, 1996).

✓ Méthode 2 :

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Elle est mise en évidence sur un milieu de Moëller (Moëller, 1955), à partir de chaque souche lactique isolée, ensemencer un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine), recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine stérilisée. Après 2 à 6 jours d'incubation à 30°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose) (Larpent *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2002).

La dégradation de l'arginine aboutit à la formation d'ammoniaque qui est révélée par l'alcalinisation du milieu qui devient violet.

➤ L'hydrolyse de l'esculine :

Elle est mise en évidence par l'API 50CH, la cupule contenant l'esculine est ensemencée puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

*Le noircissement indique que la réaction est positive.

➤ Métabolisme ou fermentation des hydrates de carbone sur les galeries API 50 CH:

Les galeries API 50 CH permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et même parfois de la sous-espèce sur la base de la fermentation de 49 sucres différents.

La galerie API 50 CH (Biomérieux) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

✓ Mode opératoire :**❖ Sélection des colonies :**

- ✓ Vérifier la pureté de la souche, car seules des cultures pures contenant un seul type de microorganismes doivent être utilisées.
- ✓ Vérifier son appartenance aux bactéries lactiques : bactéries Gram (+), catalase (-), anaérobies (stricts ou facultatifs), bacilles poussant sur milieu MRS.

❖ Préparation des galeries :

- ✓ Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.
- ✓ Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- ✓ Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- ✓ Répartir environ 10 mL d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- ✓ Sortir les bandes de leur emballage, séparer les bandes et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.

❖ Préparation des inoculum :

Chaque souche lactique (lactobacille) isolée et purifiée est ensemencée dans le milieu MRS liquide puis incubée à 30° C pendant 18h.

❖ Inoculation de la galerie :

- ✓ Répartir chaque suspension bactérienne dans les 50 tubes de la galerie à l'aide d'une micropipette stérile.
- ✓ Recouvrir les tubes tests avec de l'huile de paraffine stérile.
- ✓ Incuber à 30° C, en aérobiose pendant 48 heures.

❖ Lecture de la galerie :

- ✓ La lecture des résultats se fait après 24 et 48 heures d'incubation.
- ✓ Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres se traduit par un changement de couleur dans les tubes, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH (pourpre de bromocrésol).
- ✓ La réaction est considérée positive lorsqu'il y'a un changement de couleur dans les tubes comme suit :
 - ✚ Virage de la couleur du violet vers le jaune dans les tubes de 1 à 49.
 - ✚ Virage vers le noir pour le test de l'esculine dans le tube n° 25 de la galerie.
 - ✚ Le tube N° 0, sans principe actif, sert de témoin négatif.

- ✓ Interpréter chaque test en mettant (+) pour la réaction positive et (-) pour la réaction négative.
- ✓ Enregistrer les résultats sur la fiche de résultats (**Figure 12**).

Figure 12: Fiche de résultats de la galerie API50CH.

- ✓ Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification « **ApiWeb** » de «Biomérieux», avec un pourcentage de similitude très élevé (Sneath, 1973 ; Prescott *et al.*, 2003).

3- Etude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle :

3-1- Le pouvoir acidifiant (Production d'acide lactique) :

L'aptitude technologique des bactéries lactiques est souvent basée sur l'étude du pouvoir acidifiant.

Les bactéries lactiques sont employées dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire comme agents biologiques de conservation pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits alimentaires à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, les végétaux et les céréales. Cette conservation est due principalement à leur pouvoir acidifiant en produisant de l'acide lactique.

❖ Etude de la cinétique de croissance et d'acidification des lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle dans le milieu lait écrémé à 30°C :

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude caustique.

Chaque souche lactique isolée à partir du lait de chamelle a étéensemencée d'abord sur milieu MRS liquide et incubée à 30 °C pendant 18h, ensuite 100 µL de la culture précédente a été inoculé dans un tube contenant 10 mL du lait écrémé incubé à 30°C pendant 18h, ensuite 100 µL de cette pré culture est additionné à une série de tubes de 10 mL chacun de lait écrémé. La série est pour étudier la cinétique de croissance et d'acidification à chaque point d'observation choisi (0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48h) (Guessas *et al.*, 2007) (**Figure 13**).

➤ Mesure de pH :

L'acidité développée dans le milieu lait écrémé est suivi par une mesure de pH à l'aide d'un pH mètre.

➤ Mesure de l'acidité titrable :

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait est effectué selon la méthode de titrage avec la soude caustique NaOH (1N) décrite par (Accolas *et al.*, 1977).

➤ **Dénombrement des souches lactiques (lactobacilles) :**

La croissance bactérienne a été suivie par la réalisation des dénombrements périodiques des lactobacilles sur gélose (MRS) toutes les deux heures pendant la période d'incubation.

Des dilutions décimales (allant de 10^{-1} à 10^{-5}) ont été réalisées à partir de chaque tube et à chaque point d'observation. Un volume de 1ml de chaque dilution a été ensemencé sur le milieu solide (MRS), puis incubé à 30°C.

Les colonies ont été comptées pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre de colonies} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \text{Nombre de colonies} \times \frac{1}{V_e} \times \frac{1}{D}$$

Ve : Etant le volume d'ensemencement

D : Etant la dilution prise en compte.

Le résultat final du comptage des colonies a été converti en Logarithme Décimal (Log UFC/mL) en suivant les recommandations établies par Alomar (2008).

Les caractéristiques de la croissance (taux de croissance, temps de génération) sont calculées selon les formules décrites par Hassan *et al.*, (1989).

- **Taux de croissance : (μ)**

C'est la vitesse avec laquelle la bactérie croît dans le milieu, ce taux est donné par la relation suivante :

$$\text{Taux de croissance}(\mu) = \frac{\log N_n - \log N_0}{t \times \log 2}$$

$$\text{Taux de croissance} = \text{pente} \times \frac{\text{Log } 10}{\text{Log } 2}$$

- **Le temps de génération (G) :** C'est le temps de doublement moyen de la population.

$$(G) = \frac{1}{\mu}$$

Les vitesses d'acidification et de production d'acide lactique de chaque souche lactique étudiée sont estimées par le calcul de la pente de la droite de régression de la courbe de variation du pH et d'acidité Dornic.

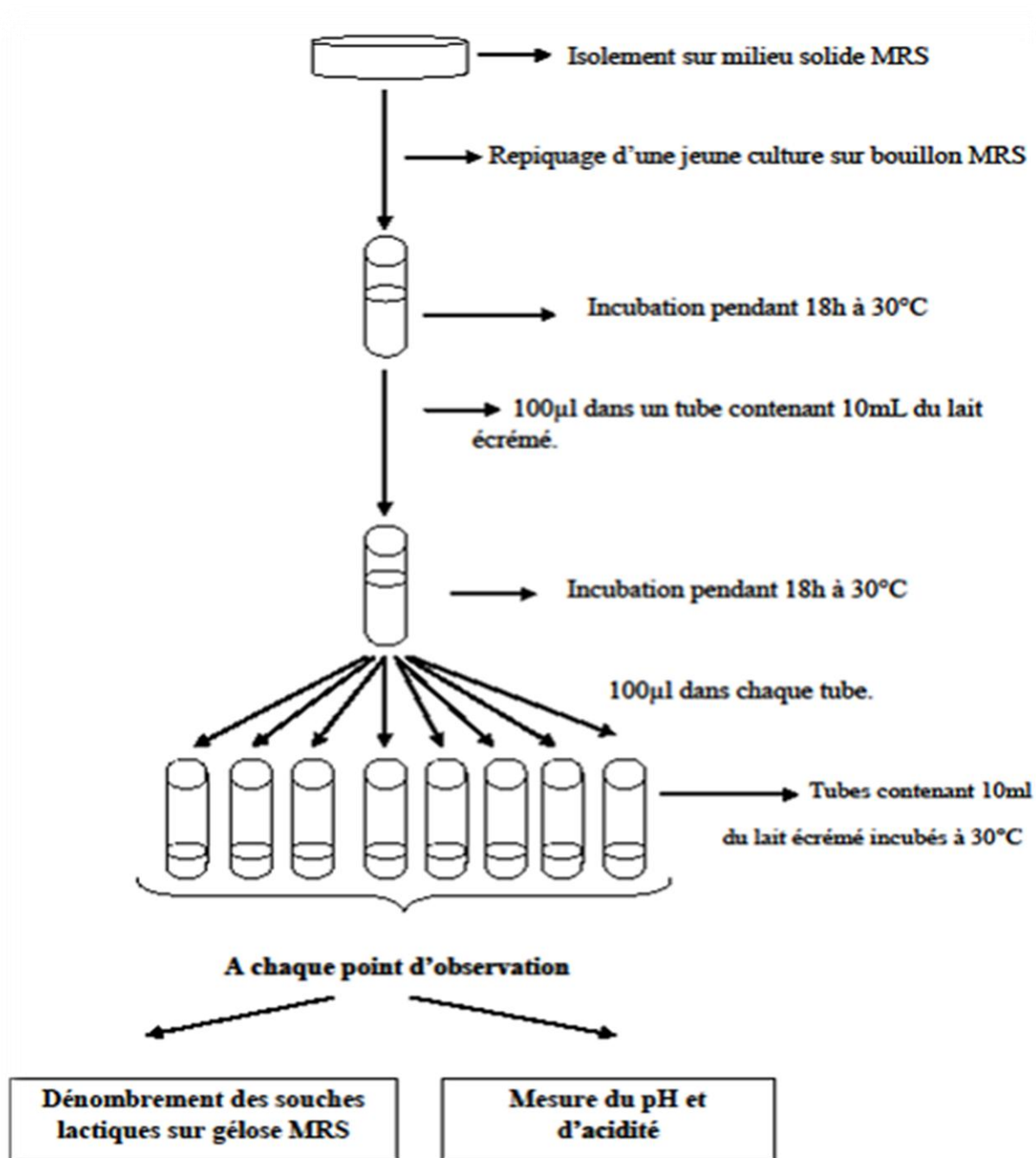


Figure 13: Schéma du protocole appliqué pour l'étude de la cinétique de croissance et d'acidification sur milieu lait écrémé.

3-2- Pouvoir protéolytique (Protéolyse des caséines du lait):

Dans les produits laitiers, les bactéries lactiques assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait par la protéolyse des caséines du lait pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture des fromages (Doguiet, 2010).

L'aptitude à la protéolyse des caséines du lait des différentes espèces du genre *Lactobacillus* isolées du lait de chamelle dans cette étude est recherchée sur milieu MRS liquide, dont la peptone a été remplacée par la caséine du lait.

L'appréciation de l'activité protéolytique se fait par l'apparition d'un coagulum du à l'hydrolyse de la caséine (Badis *et al.*, 2004).

3-3- Pouvoir aromatisant (Production des composés aromatiques):

3-3-1- Production d'acetoïne :

Les bactéries lactiques produisent en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le di acétyle et l'acétaldéhyde, qui sont responsables des saveurs caractéristiques et les caractères organoleptiques du lait dans la fabrication du yaourt (Doguiet, 2010).

La recherche de l'acetoïne (acétylméthylcarbinol) est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (Zourari *et al.*, 1991).

Les souches lactiques isolées sont ensemencées dans le milieu Clark et Lubs. Après une incubation de 24h à 30°C sur ce milieu on ajoute 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude caustique NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (L'alpha-naphtol). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min.

La présence d'acetoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rouge ou rose en surface du milieu mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

3-3-2- Hydrolyse du citrate :

C'est un examen qui affirme l'utilisation du citrate par les bactéries lactiques comme seule source de carbone et d'énergie.

Méthode 1 :

L'utilisation du citrate est détectée sur le milieu KMK (Kempler and Mc Kay, 1980). Après l'incubation à 30°C pendant 24h à 48h, les colonies qui fermentent le citrate sont des colonies bleues ou ayant un centre bleu (Citr+). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Citr-).

Méthode 2 :

Certaines bactéries sont capables d'assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie et donc capable de croître sur un milieu synthétique tel que le milieu citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium. Ce milieu contient comme indicateur coloré du pH le bleu de bromothymol de teinte verte à pH 7.

A l'aide d'une pipette Pasteur prélever une colonie isolée sur milieu MRS solide et faire un ensemencement par une strie centrale et incuber à 37°C pendant 1 à 10 jours.

L'utilisation du citrate produit une alcalinisation du milieu qui fait virer l'indicateur du pH au bleu, en cas de non utilisation du citrate le milieu demeure vert.

3-4- Test de thermo résistance :

Elle est mise en évidence sur bouillon MRS. Le test est réalisé à 60°C pendant 30 minutes. On apprécie la croissance par l'apparition d'un trouble (Badis *et al.*, 2004).

4- L'étude du pouvoir antagoniste des isolats du lait de chamelle vis-à-vis des contaminants pathogènes du lait:

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir les pré-cultures des souches lactiques et les pré-cultures des souches pathogènes.

4-1- Préparation des pré-cultures bactériennes :

➤ Les pré-cultures des souches lactiques :

- A partir d'une jeune culture pure de 18 h de chaque souche lactique ensemencée sur milieu MRS solide), racler à l'aide d'une anse en platine stérile quelques colonies bien isolées et identiques.
- Décharger l'anse dans un tube à essai contenant 10 mL de bouillon MRS.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- Standardiser les suspensions bactériennes préparées de telle façon que leurs densités optiques (DO) ou leurs turbidités soient équivalentes à celle du standard N° 0,5 de Mc Farland en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde comprise entre 600 et 625 nm. L'absorbance entre 600 et 625 nm doit être comprise entre 0,08 to 0,13.
- La turbidité est diminuée en ajoutant plus de bouillon MRS ou augmentée en ajoutant plus de colonies bactériennes.
- Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 18h en anaérobiose.

➤ Les pré-cultures des souches pathogènes :

- De la même manière que les souches lactiques, les souches pathogènes ont été ensemencées chacune dans un tube à essai contenant 10 mL de bouillon nutritif puis homogénéisées de telle façon que la turbidité de chaque suspension bactérienne doit être équivalente à celle du standard N° 0,5 de Mc Farland en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde comprise entre 600 et 625 nm, car un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits et inversement.
- L'absorbance entre 600 et 625 nm doit être comprise entre 0,08 to 0,13.
- Le standard N° 0.5 de Mc Farland a été utilisé comme étalon pour la préparation des inoculums bactériens standardisés (charges microbiennes équivalentes dans chaque inoculum) nécessaires pour le test de sensibilité des souches pathogènes aux agents antimicrobiens dérivant des souches lactiques isolées. Il correspond approximativement à une suspension bactérienne homogène de $1,5 \times 10^8$ Cellules/ mL, Mc Farland, (1907).
- Les tubes sont incubés à 37°C pendant 18h.

4-2- Détection de l'activité antagoniste des bactéries lactiques issues du lait de chamelle vis-à-vis des pathogènes testés par la méthode d'anti biographie ou de diffusion des disques imprégnés sur gélose TSA :

Cette méthode consiste à couler 20 mL de milieu (Tryptic-Soja-Agar) TSA dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification, les boîtes ont été inondées par 1mL des pré-cultures standardisées des souches pathogènes ($DO_{600.625}$ varie entre 0.08 et 0.13). Après séchage on dépose à la surface de la gélose TSA des disques en papier buvard stérile de 9mm de diamètre pré-imprégnés des pré-cultures standardisées de bactéries lactiques. La diffusion des substances responsables des interactions bactériennes est améliorée par une incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures (Tadesse *et al.*, 2004 ; Doumandji *et al.*, 2010 ; Allouche *et al.*, 2010).

Les disques une fois déposés ne peuvent plus être déplacés car la diffusion des substances responsables des interactions bactériennes est très rapide.

Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les pré-cultures des souches lactiques. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Le nombre maximum de disques est fonction des bactéries utilisées car certaines souches sensibles donnent des zones très larges. Un maximum de six disques convient pour les boîtes rondes de 90 mm et douze pour celles de 150 mm.

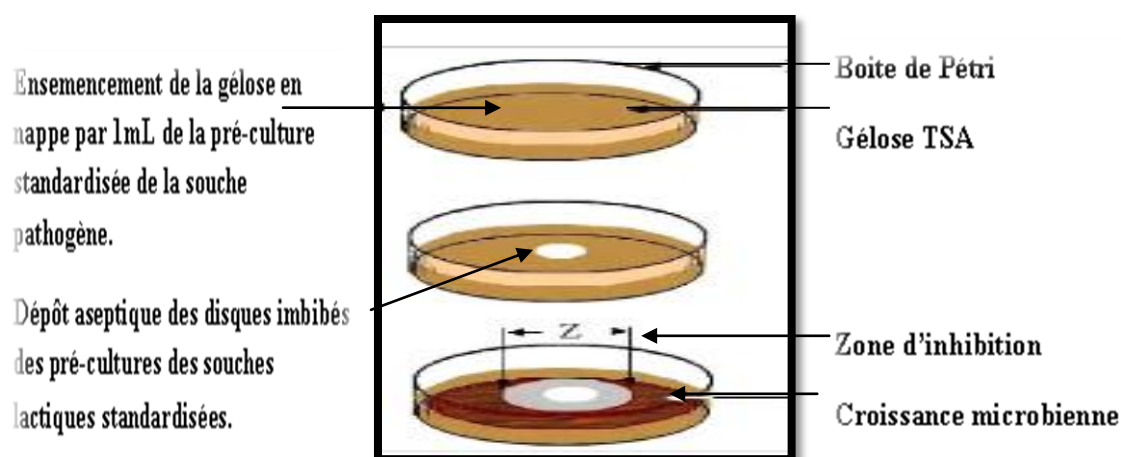


Figure 14: La méthode d'anti biographie ou de diffusion des disques en milieu gélosé (TSA)

4-3- Estimation du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes testées :

L'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes se révèle par l'apparition des zones claires d'inhibition autour des disques.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition (Z_i) qui apparaissent autour des disques, se fait selon la formule suivante :

$$Z_i \text{ en (mm)} = \text{Diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{Diamètre de disque (9mm)}$$

Les zones d'inhibition ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positives (Guessass, 2007).

Les résultats obtenus pour les diamètres des zones d'inhibition pour chaque souche lactique vis-à-vis des six pathogènes testés ont été reproduits en triplicata c'est-à-dire que chaque test a été répété au minimum trois fois pour la même interaction. L'analyse statistique des données (Analyse de la variance $p=0.05\%$) a été réalisée par le logiciel statistique *SPSS*. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm écart-types.

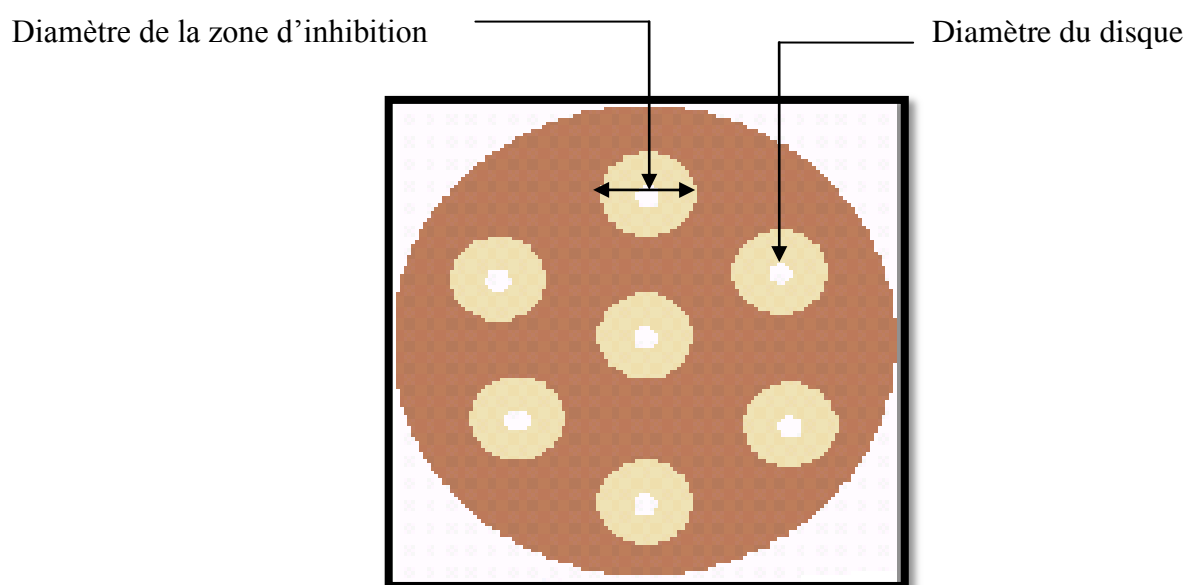


Figure 15: Les zones d'inhibition (Z_i).

4-4- Confirmation de l'antagonisme par l'étude comparative de la cinétique de croissance de *S.aureus* en culture pure et en culture mixte avec le surnageant brute de *Lb.plantarum* et la mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur :

L'inhibition de la croissance des souches pathogènes peut être due à l'acidification du milieu par la production d'acide lactique, à la production de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ou à la synthèse des bactériocines.

➤ Choix de la souche :

Dans le but d'étudier *in vitro* l'antagonisme des bactéries lactiques issues du lait de chamelle vis-à-vis des souches pathogènes, nous avons choisi la souche lactique la plus performante ayant montré le plus grand potentiel inhibiteur (plus grande zone d'inhibition Zi) en appliquant la méthode de diffusion des disques.

Dans cette partie travail, nous avons choisi *Staphylococcus aureus* comme souche pathogène test pour plusieurs raisons :

- ✓ Etant la souche pathogène la plus sensible aux souches lactiques étudiées (La souche qui a montré la plus grande zone d'inhibition).
- ✓ Cette espèce appartient à la flore de contamination pathogène très fréquente des produits alimentaires particulièrement, les produits laitiers dans le cas des mammites « Inflammation de la mamelle d'origine bactérienne » (Trias, 2008).
- ✓ Elle est sensible aux bactériocines (Choi, 2000 ; Allouche *et al.*, 2010) notamment à la nisine.
- ✓ C'est une espèce pathogène, responsable de nombreuses maladies chez l'homme et chez l'animal.
- ✓ Elle est catalase positive, cette propriété permet d'éliminer l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ dans les tests d'antagonisme et dans les cultures mixtes.
- ✓ Cette souche est exigeante d'un milieu sélectif ; sa culture est facile en milieu hyper salé de Chapman.

➤ **Protocole expérimentale :**

Un échantillon de 150 mL du lait bovin reconstitué (lait écrémé 10g +100ml d'eau distillée) a été stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 secondes, puis contaminé par 1mL de la pré-culture de *Staphylococcus aureus*, puis cet échantillon du lait contaminé a été divisé en trois séries de flacons (tubes) (**Figure 18**).

4-4-1-Confirmation de l'antagonisme de *L.plantarum* par l'étude comparative de la cinétique de croissance de *S.aureus* en culture pure et en culture mixte :

➤ **Dans la première série (tube 1) :**

Le lait contaminé par 1mL de la pré-culture de *S. aureus* a été incubé directement à 37°C pendant 8 heures (Culture pure).

➤ **Dans la deuxième série (tube 2) :**

Le lait contaminé par 1ml de la pré-culture de *S.aureus* dans le flacon 2 a été traité par 1mL du surnageant actif de la pré-culture de *L.Plantarum* isolée à partir de lait de chamelle, puis incubé à 37°C pendant 8 heures (Culture mixte).

✚ **Préparation de surnageant actif de *L.plantarum* :**

Une culture jeune de 18h de *L.Plantarum* estensemencée à partir de milieu MRS solide dans un tube à essai contenant 1 mL de bouillon MRS. Le tube est ajusté à 10mL par MRS liquide, puis incubé à 37°C pendant 18h en anaérobiose.

La suspension bactérienne préparée est centrifugée à raison de 8000 tours/min pendant 10 minutes. On récupère le surnageant.

L'antagonisme a été confirmé par une étude comparative de la cinétique de croissance de *S. aureus* en culture pure dans le flacon (1), et en culture mixte (*S.aureus*+ surnageant actif de *L. plantarum*) dans le flacon (2) (**Figure 16**).

L'estimation de la concentration bactérienne de *S.aureus* en culture pure et mixte a été faite en réalisant des dénombrements bactériens périodiques exprimés en UFC/mL (toutes les deux heures durant la période d'incubation).

4-4-2-Mise en évidence de la nature chimique des substances inhibitrices :

Afin de déterminer la nature des substances inhibitrices produites par les souches lactiques étudiées, il est impératif de réaliser une série de test (Guessas, 2007).

4-4-2-1- L'étude de l'effet de l'acide lactique produit :

➤ Dans la troisième série (tube 3) :

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions par les bactéries lactiques. Afin d'éliminer son effet, le lait contaminé par 1mL de la pré-culture de *S. aureus* dans le flacon 3 a été traité avec 1mL du surnageant neutralisé à pH : 6,5 à 7 avec une solution de NaOH (1N) de la pré-culture de *L.Plantarum* puis incubé à 37°C pendant 8 heures (Culture mixte).

Le surnageant est neutralisé jusqu'au pH 6.5 à 7 avec NaOH (1N), afin de lever l'activité antibactérienne exercée par les acides organiques (Jrad *et al.*, 2013).

Pour mettre en évidence la nature chimique des agents responsables de l'inhibition de *S.aureus* par *L. plantarum*, nous avons essayé de montrer l'effet des acides organiques produits par *L.plantarum* sur la cinétique de croissance de *S. aureus* dans le lait reconstitué en culture mixte (flacons 2 et 3) c'est-à-dire avec neutralisation et sans neutralisation des acides organiques dérivant des activités métaboliques de *L. plantarum* avec la solution de NaOH (1N).

Des dénombrements comparatifs de *S. aureus* ont été effectués toutes les 2 heures pendant la période d'incubation entre les deux flacons 2 et 3 (**Figure 16**).

Dénombrement de *Staphylococcus aureus* :

Des dilutions décimales (allant de 10^{-1} à 10^{-5}) ont été réalisées à partir de chaque flacon, afin de dénombrer *S. aureus*.

Un volume de 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-5}) a été ensemencé en surface du milieu Chapman (milieu sélectif pour la croissance de *S. aureus*), puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h (Kaban et Kaya ,2006).

Les prélèvements et les ensemencements ont été réalisés à temps régulier, toutes les deux heures pendant l'incubation. (0h, 2h, 4h, 6h, 8h).

Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre de colonies} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \text{Nombre de colonies} \times \frac{1}{V_e} \times \frac{1}{D}$$

***V_e** : Etant le volume d'ensemencement

***D** : Etant la dilution prise en compte.

Le résultat final du comptage des colonies a été converti en logarithme décimal (Log UFC/mL) en suivant les recommandations établies par Alomar (2008).

Seulement les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies de *S.aureus* sont prises en compte (Guessas *et al.*, 2007 ; Kaban et Kaya 2006).

Expressions des résultats et analyse statistique :

Tous nos résultats sont évalués à partir de trois répétitions parallèles des expériences. Les valeurs présentées sont les moyennes arithmétiques \pm écart type des répétitions. La significativité des différences observées est évaluée en réalisant le test d'Anova (SPSS). Le seuil de significativité est fixé à $p= 0,05$.

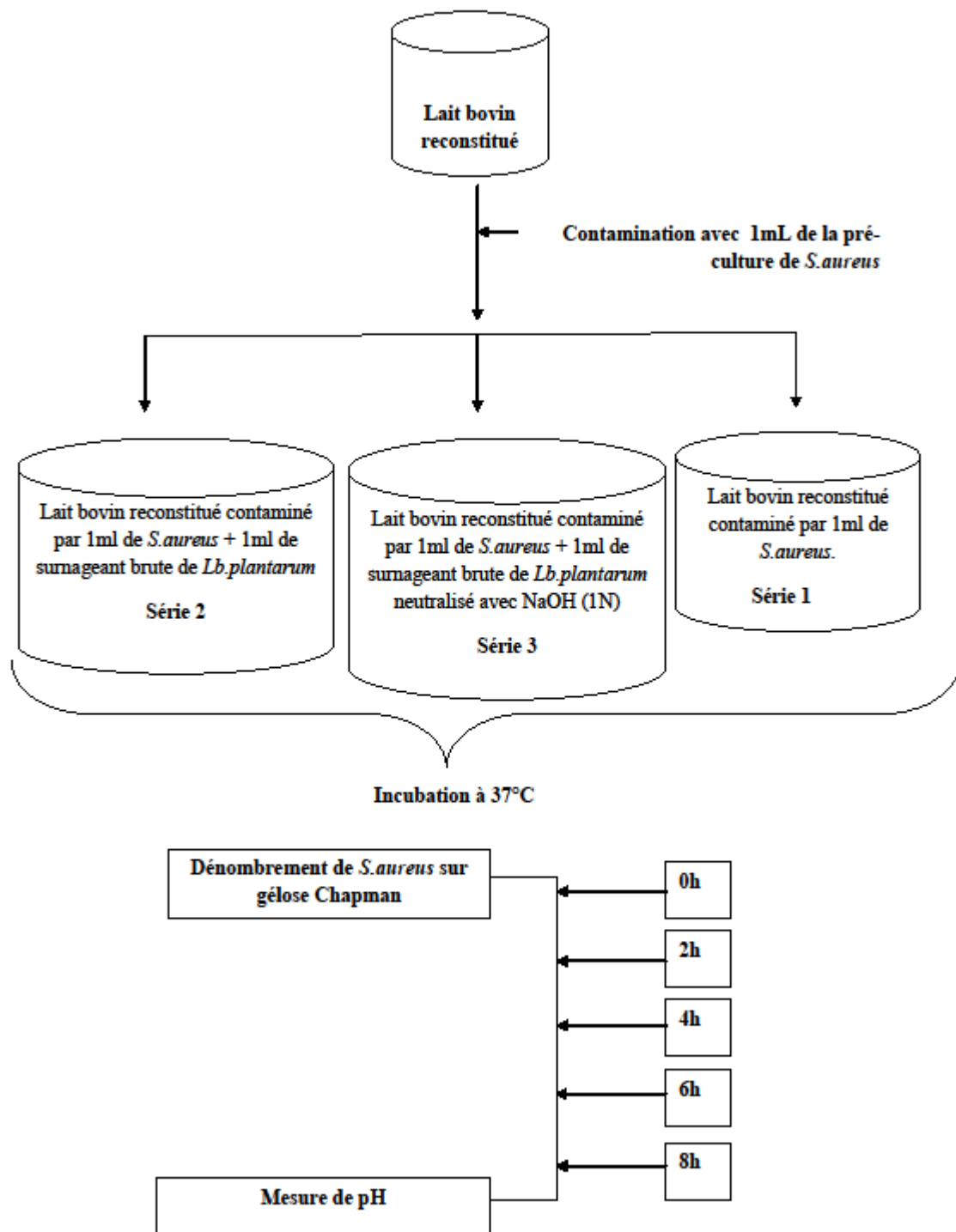


Figure 16: Protocole de confirmation de l’antagonisme en culture mixte et la mise en évidence du rôle d’acide lactique dans l’inhibition.

4-4-2-2- Recherche de la nature protéique des substances inhibitrices (Bactériocines) :

Deux critères sont indispensables pour qu'une substance antibactérienne soit définie en tant que bactériocine (Klaenhammer, 1988) :

- Un mode d'action bactéricide.
- La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique.

Détermination du mode d'action « bactéricide ou bactériostatique »:

L'effet inhibiteur des lactobacilles peut être bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis des bactéries pathogènes. Pour détecter l'effet des bactériocines s'il est bactériostatique ou bactéricide deux méthodes sont appliquées:

❖ Méthode 1 :

Consiste à mettre dans des tubes contenant 5 mL de bouillon nutritif, un fragment de gélose pris dans la zone d'inhibition, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. L'apparition de trouble dans le tube après incubation permet de déduire que les bactéries pathogènes sont toujours vivantes et capables de se multiplier, donc l'effet inhibiteur est bactériostatique. Mais si le contenu du tube reste clair ceci confirme que l'effet est bactéricide (Boussouar, 2011).

❖ Méthode 2 :

De la même manière un fragment de gélose est pris de la zone d'inhibition, mais cette fois ci, il est étalé à la surface de la boîte de Pétri contenant la gélose nutritive. Le développement des colonies se traduit par un effet bactériostatique (Boussouar, 2011).

L'étude de l'action des enzymes protéolytiques et le traitement thermique sur l'apparition des zones d'inhibition en présence de *S. aureus* :

a- Action des protéases :

Afin de déterminer la nature protéique de la substance inhibitrice secrétée par *L.plantarum*, le surnagent neutralisé avec une solution de NaOH (1N) de cette culture lactique à pH : 6,5 à 7 est traité par deux types d'enzymes protéolytiques sécrétées par l'estomac: la trypsine et la pepsine à

raison de 1mg par ml de surnagent, puis incubés pendant 24h à 37°C, afin de permettre le contact avec l'enzyme et assurer ainsi la réaction bactériocine-enzyme. L'activité résiduelle de surnagent traité est testée par la méthode des puits.

On utilise deux enzymes protéolytiques à concentration finale d'enzyme 1mg/1mL respectivement de trypsine et de Pepsine. Cette étape nous donnera une idée sur les séquences en AA des peptides bioactifs, car les deux enzymes protéolytiques utilisées ont des sites de coupures différents. La trypsine coupe à droite des acides aminés basiques et la pepsine, à gauche des acides aminés neutres.

b- Action de la chaleur :

L'effet de la température sur l'agent antimicrobien est étudié de la manière suivante : 1ml de surnagent de *L. plantarum* neutralisé à pH 6,5 à 7 avec une solution de NaOH (1N) est placé dans un « Eppendorf » puis incubé pendant 30 mn à 120°C pour assurer la dénaturation des protéines. L'activité résiduelle est testée par la méthode des puits.

❖ Test des puits :

Des boites de Pétri contenant la gélose nutritive sontensemencées avec la souche cible (*S. aureus*). Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne de *S. aureus* et rejeter l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide sur l'écouvillon pour éviter une sur-inoculation des boites.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement dans la gélose de chaque boite avec le bout circulaire d'une pipette Pasteur ou d'une cloche de Durham stérile (**Figure 17**). On remplit les puits avec 50 µL de :

- Surnageant actif de *Lb.plantarum* non neutralisé.
- Surnageant neutralisé à pH 6,5-7 avec une solution de NaOH (1N) de *L. plantarum*.
- Surnageant neutralisé traité avec la trypsine à raison de 1mg par ml de surnagent.
- Surnageant neutralisé traité avec la pepsine à raison de 1mg par ml de surnagent.
- Surnageant neutralisé traité avec la chaleur (**Figure 18**).

On place les boites à 4 °C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne (Metlef et Dilmi-Bouras, 2009; Doumandji *et al.*, 2010; Allouche *et al.*, 2010). Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

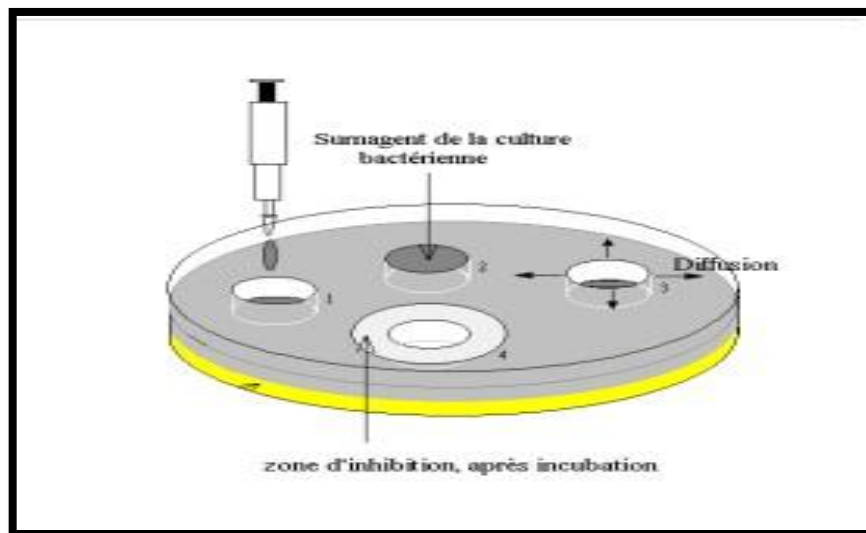


Figure 17: Méthode de diffusion en puits.

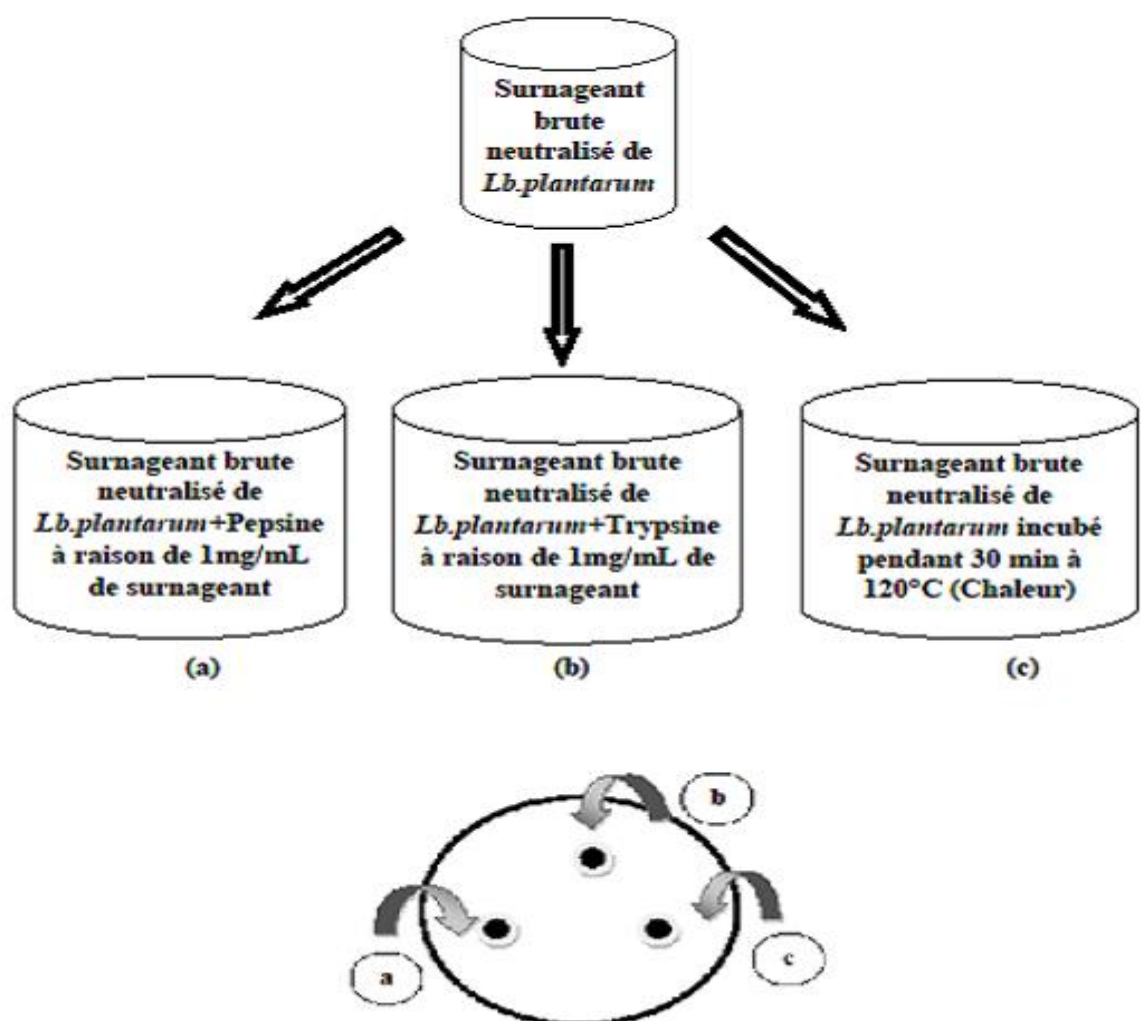


Figure 18: Protocole d'inactivation des substances inhibitrices d'origine protéique par l'action des protéases et de traitement thermique



Résultats
et
Discussion

Résultats et discussion :

Le lait de chamelle constitue un milieu favorable pour la croissance d'une collection de flore lactique protectrice très variée. La différence réside dans les genres rencontrés et leur répartition. Ceci est du fait de ses propriétés physicochimiques particulières (Son pH, son acidité et sa composition en éléments nutritifs) qui dépendraient de l'animal, de sa localisation géographique, du type de fourrage ingéré ainsi que la saison (Zadi-Karam et Karam, 2006).

I- Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin :

Le lait de chamelle est de couleur blanche mate (Yagil, 1982 ; Farah, 2004 ; Al haj et AL kanhal, 2010 ; Mal et Pathak, 2010), il a un goût un peu salé (Yagil, 1982 ; Farah, 2004 ; AL haj et AL kanhal, 2010 ; Mal et Pathak, 2010 ; EL imam Abdalla, 2012 ; Prajapati *et al*, 2012). Cette caractéristique diffère selon l'alimentation et la disponibilité en eau (Farah, 1993). L'ingestion de certaines plantes halophytes le rend salé (Farah, 1993; Siboukeur, 2007; haj et AL kanhal, 2010 ; EL imam Abdalla, 2012).

Les propriétés physicochimiques du lait camelin étudié, à savoir le pH, l'acidité titrable et la densité ont été déterminés parallèlement à celles du lait bovin, dans un but comparatif. Les résultats sont illustrés dans la **(figure 19)**.

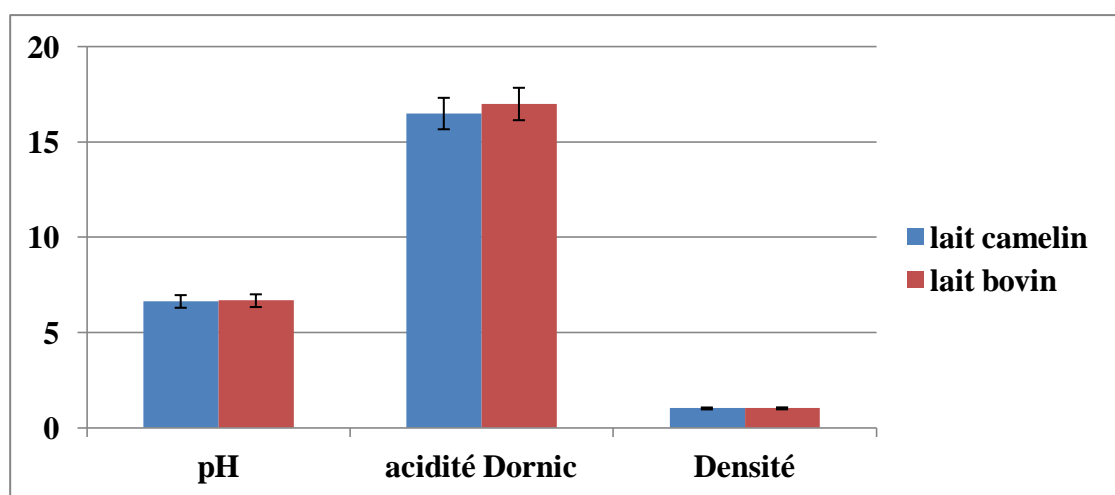


Figure 19: Principales caractéristiques physico chimiques du lait camelin, en comparaison avec le lait bovin.

1 -Le pH :

Le pH moyen de nos échantillons du lait camelin ayant fait l'objet de cette étude égale à 6.64 ± 0.15 , il est comparable à celui des échantillons du lait bovin qui égale à 6.68 ± 0.03 en moyenne. Le lait de chamelle à l'état frais est plus acide et moins dense que les laits : bovin et humain dont les valeurs du pH sont respectivement égales à 6,68 et 7,01 (Sboui *et al.*, 2009).

Plusieurs auteurs ont révélé des valeurs de pH du lait de chamelle proches de nos résultats. Parmi ces auteurs, on peut citer, Kihal *et al.*, (1999) à Bechar ; Mahboub (2010) à Ouargla et Rahli (2015) à Bechar qui ont enregistré des valeurs de pH proches soient $6,65 \pm 0,13$; $6,57 \pm 0,32$ et $6,6 \pm 0,2$ respectivement.

En revanche, Sboui *et al.*, (2009) en Tunisie, Siboukeur (2005) à Ouargla et Sawaya *et al.*, (1984) en Arabie Saoudite ont trouvé des valeurs de pH inférieures, soient $6,41 \pm 0,1$, $6,31 \pm 0,15$ et $6,49 \pm 0,024$ respectivement.

Le pH ainsi que le goût du lait de chamelle peuvent dépendre de la nature des fourrages et de la disponibilité en eau (Gorban et Izzeldin ,1997). De plus, La teneur relativement élevée en vitamine C du lait de dromadaire, est à l'origine du pH bas comparé au lait bovin (Saley, 1993).

Il a été montré que le pH bas du lait camelin est dépendant de la teneur en citrates, phosphates et caséines, ainsi, que de l'état sanitaire de la mamelle (Mathieu, 1998).

2 -L'acidité Dornic :

Le lait bovin présente une acidité Dornic d'ordre de 17 ± 0.5 , qui est plus élevée que celle du lait camelin obtenue qui est d'ordre de 16.5 ± 0.25 . Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Rahli (2015) qui se situent entre 16.28 et 16.4 (°D) pour le lait camelin. Elles sont toutefois, basses par rapport à celles obtenues par Siboukeur (2007) qui sont de l'ordre de $18.2^{\circ}\text{D} \pm 2.93$; par Mahboub (2010) à Ouargla qui sont de l'ordre de $21,3 \pm 1,44$ °D pour le lait camelin et par Sboui *et al.*, (2009) en Tunisie ou elles étaient de l'ordre de $17,2$ °D ± 1.03 pour le lait camelin et 17.12 °D ± 0.64 pour le lait bovin.

Il est important de préciser que le lait camelin est caractérisé par un effet tampon plus élevé par rapport au lait bovin (Kamoun et Bergaoui, 1989 ; Abutarbousch, 1998). C'est-à-dire que le pH arrive à se maintenir approximativement au même niveau malgré l'élévation de l'acidité Dornic, ce qui explique l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité Dornic (Kamoun, 1994).

Cela permet d'expliquer pourquoi l'acidité de ce lait est plus faible que celle du lait bovin bien que leurs pH soient comparables (Abutarbusch, 1998 ; Siboukeur, 2007).

Les variations dans les valeurs d'acidité sont généralement dues à la variation de l'alimentation des animaux, aux conditions environnementales ainsi qu'à la période de lactation (Abutarbousch, 1998).

3 -La densité :

La densité moyenne des échantillons du lait camelin collectés dans cette étude est égale à 1.025 ± 0.002 . Cette valeur se situe dans la fourchette des résultats signalés par certains auteurs : (Kamoun, 1995 ; Abidi, 2001 ; Siboukeur, 2007 ; Mahboub, 2010 et Rahli, 2015) soient 1.028 ± 0.002 ; 1.020 ± 0.004 ; 1.023 ± 0.0045 ; 1.027 ± 0.006 et $1.0220 - 1.0310$ respectivement.

La densité dépend directement de la teneur en matière sèche qui est liée fortement à la fréquence de l'abreuvement (Siboukeur, 2007).

La densité moyenne des échantillons du lait de vache égale à 1.030 ± 0.002 . Elle est plus élevée que celle du lait camelin. Ces constatations ont été évoquées par de nombreux auteurs (Ramet, 2003 ; Siboukeur, 2007).

En effet, la densité relativement faible du lait camelin représente l'une de ses principales caractéristiques et pose un problème pour sa transformation en fromage.

II- Isolement et identification des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle :

1-Examens morphologiques :

La morphologie des bactéries lactiques est un critère important pour leur identification.

➤ Examen macroscopique :

Un total de trente deux (32) colonies ont été isolées sur milieu MRS solide, les isolats sont apparus avec des caractères morphologiques différents. Selon ces différents caractères morphologiques, les isolats lactiques du lait camelin ont été répartis en deux groupes (tableau 16) :

Tableau 16: Caractères macroscopiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle sur milieu MRS solide.

Groupe	Caractères morphologiques			
	Taille	Forme	Couleur	Contour
Groupe 1	Moyenne (2 à 3 mm)	Circulaire et plate	blanchâtre	Régulier
Groupe 2	Petite (1 mm)	Lenticulaire et bombée	jaunâtre	Régulier

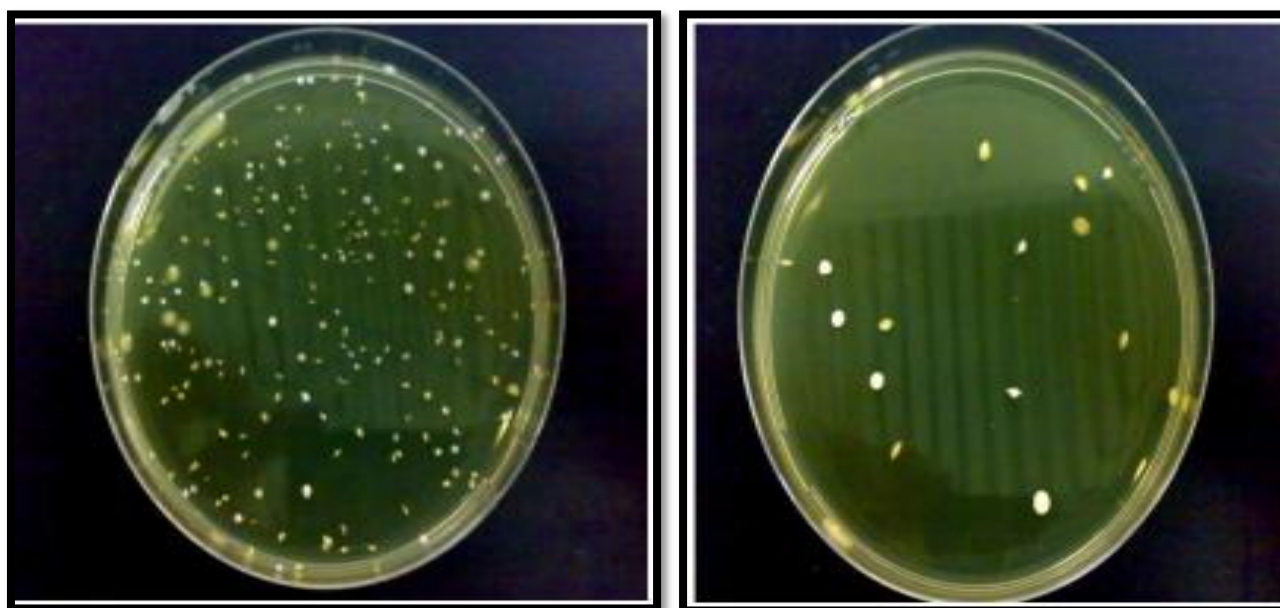


Figure 20: Aspect des colonies de bactéries lactiques isolées du lait camelin sur milieu MRS solide.

La croissance en milieu liquide est caractérisée par l'apparition d'un trouble dans les tubes contenant le bouillon MRS après une incubation à 30°C pendant 48 heures (**Figure 21**).

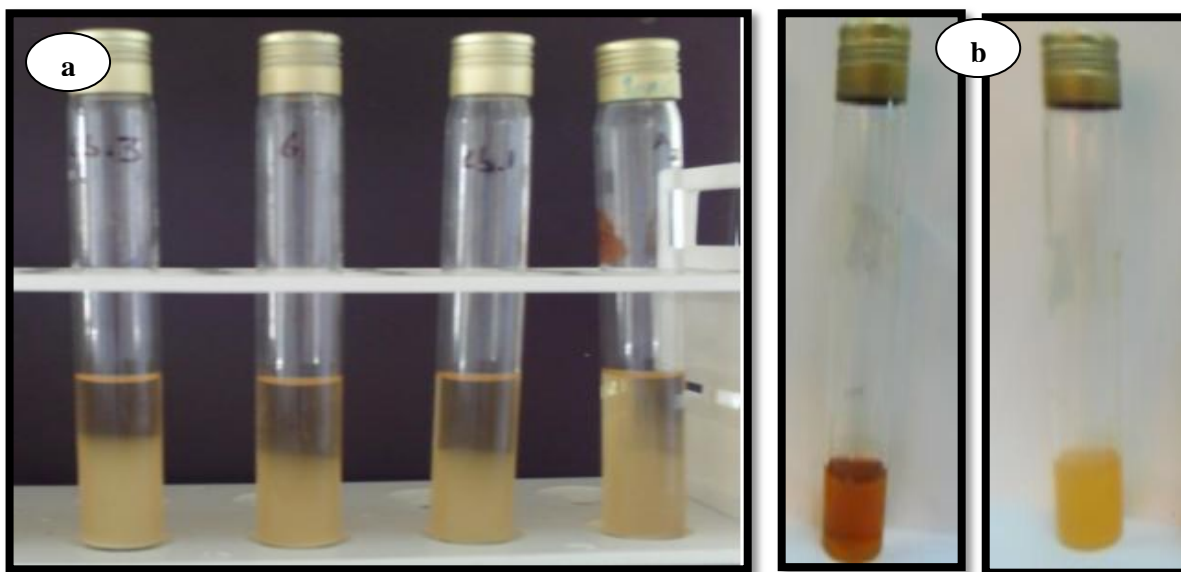


Figure 21: (a) : Aspect des colonies de bactéries lactiques dans le bouillon MRS après la croissance bactérienne. (b) : Aspect du bouillon MRS avant et après la croissance bactérienne

➤ **Examen microscopique :**

Après la coloration de Gram, on a passé à l'observation microscopique au (Gx10), (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion afin de déterminer la forme cellulaire des bactéries isolées.

La coloration de Gram révèle que parmi les trente deux souches isolées, onze isolats avaient une forme circulaire c'est des coques. Le reste apparaît sous forme de bâtonnets, c'est des bacilles avec différents modes d'associations : isolés, en paires, en chainettes et en amas.

Les Lactobacilles ont prédominé l'ensemble des bactéries lactiques isolées dans cette étude avec un pourcentage de 65,63% et 34,38% ont été sous forme de coques (**figure 22**).

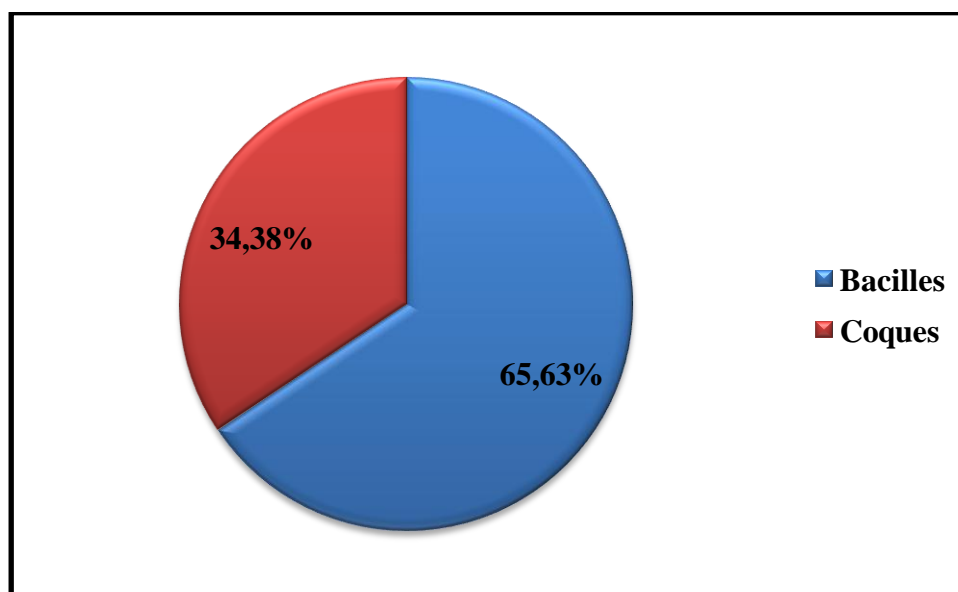


Figure 22: Répartition des souches lactiques isolées selon la forme des cellules.

A titre comparatif, le lait de chamelle de M'sila est dominé par le genre *Lactobacillus* avec un pourcentage de 44% suivi par les genres *Lactococcus* avec 33%, *Leuconostoc* avec environ 17% et *Enterococcus* avec 6% (Khedid *et al.*, 2009). Des résultats similaires concernant la dominance du genre *Lactobacillus* dans le lait camelin ont été obtenus par Ashmaig *et al.*, (2009).

Cette dominance étant due au fait que ce genre manifeste une grande tolérance à l'acidité du lait camelin. Ce genre acidophile est très répandu dans les produits fermentescibles où il contribue à la saveur par la production de diacétyl et de H₂S et sa croissance étant favorable à pH faible (DeVos *et al.*, 2009 ; König et Fröhlich, 2009).

Le genre *Lactobacillus* a été signalé comme le genre majoritaire de la flore lactique des laits de vache, de brebis et de chèvre d'Algérie (Badis *et al.*, 2005 ; Zadi-Karam et Karam, 2006).

les travaux de (Badis *et al.*, 2005) effectués sur le lait cru de chèvre des deux populations caprines Algériennes (Arabia et Kabyle), ont montré une prédominance du genre *Lactobacillus* avec (61.48%) dans la population Kabyle, alors que les genres *Leuconostoc* (32.64%) et *Lactococcus* (31.02%) ont prédominé la population Arabia.

Par ailleurs, (Guessas et Kihal, 2004), ont identifié les bactéries lactiques du lait de chèvre des zones arides et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles où *Lactococcus sp* a présenté le pourcentage le plus élevé (76.16%), suivi de *Streptococcus* (14.78%) et de *Leuconostoc* (8.6%).

Le lait de chamelle se caractérise parfois par une teneur élevée en sels, ce qui défavorise la croissance de plusieurs genres lactiques. Cependant, le genre *Enterococcus* peut y s'adapter et dominer les autres genres grâce à sa tolérance à la salinité jusqu'à une teneur de 6.5% (DeVos et al., 2009). Dans une étude similaire, Zadi-Karam et Karam (2006) ont démontré la dominance du lait de chamelle par le genre *Enterococcus* suivi des genres *Lactobacillus* ; *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Généralement la présence des entérocoques dans les produits alimentaires est considérée comme un signe de contamination fécale.

La présence de divers genres de bactéries lactiques dans le lait de chamelle était prévisible du fait que ces bactéries ont été trouvées dans la microflore de tous les laits étudiés peu importe leur origine (vache, brebis, chèvre, chamelle). La différence réside dans les genres rencontrés et leur répartition. Celle-ci pourrait dépendre de la source du lait, de la localisation géographique, du type de fourrage ingéré par l'animal, de l'état sanitaire de l'animal, de la saison, des conditions de traite, de la durée de conservation...etc (Zadi-Karam et Karam, 2006).

Les bactéries présentant une réaction positive à la coloration de Gram (Gram +) et dénuées d'activité de catalase (catalase -) sont présumées des bactéries lactiques et elles ont été retenues pour être identifiées par la suite avec d'autres tests (Karam et Karam, 2006).

Parmi les trente deux isolats lactiques obtenus (coques et bacilles), quatorze ont été retenus tous Gram + (Cellules colorées en violet), avec une forme bacillaire. Et parmi les quatorze (14) bacilles Gram positive (+) isolés, seuls quatre (4) sont catalase négative (-) ont été retenus pour être identifier ultérieurement.

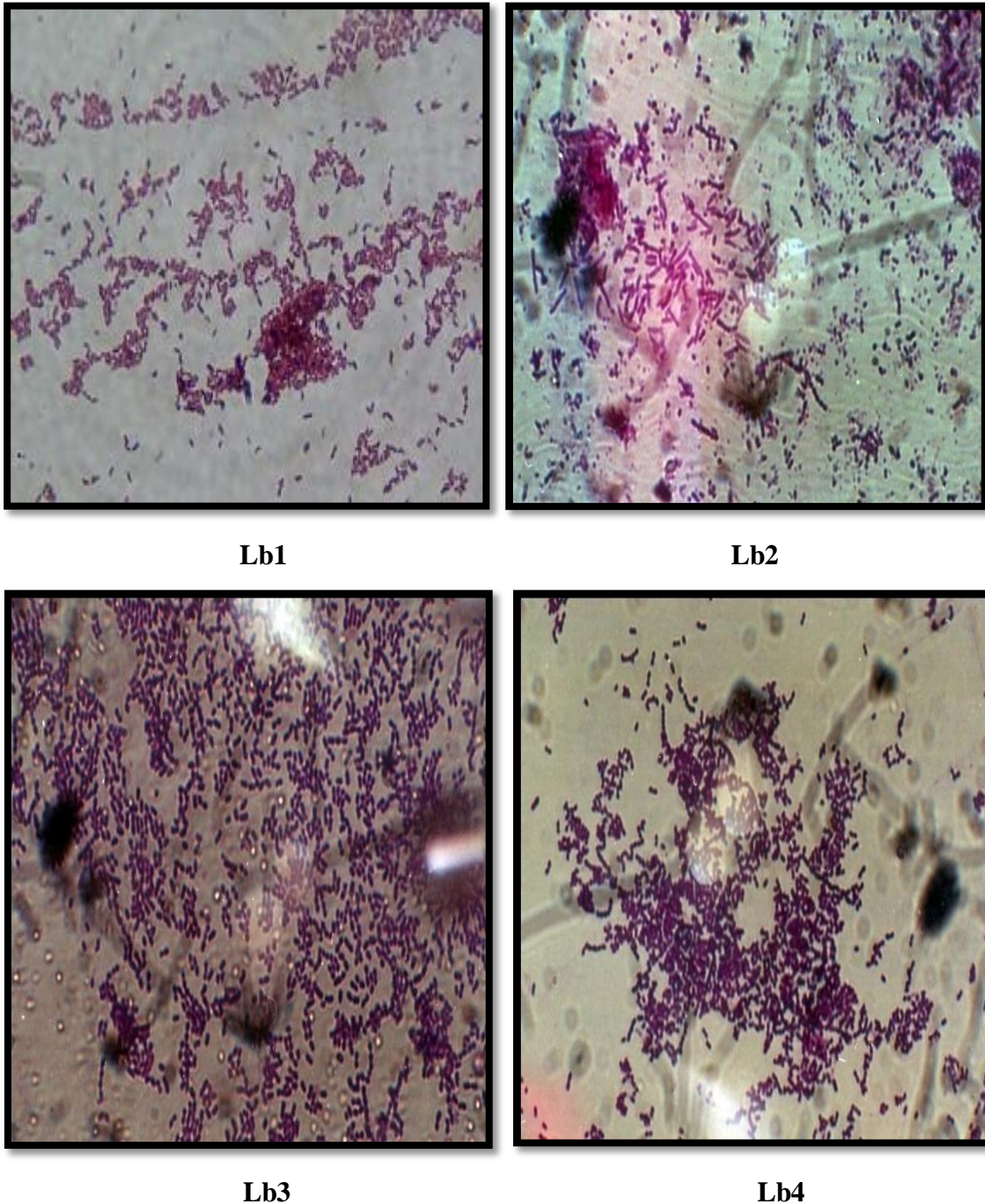


Figure 23 : Aspects microscopiques des quatre lactobacilles Gram positive isolés à partir du lait de chamelle après coloration de Gram (G : x100).

2-Tests physiologiques et biochimiques :

Les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques des lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 17: Les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats du lait de chamelle :

Caractères physicochimiques et biologiques	Les souches lactiques isolées			
	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4
Gram	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
Production de gaz (CO ₂)	+	-	-	-
Croissance à 10°C	-	-	+	-
Croissance à 45°C	+	+	-	+
Croissance à 2% NaCl	+	+	+	+
Croissance à 4% NaCl	+	+	+	+
Croissance à 6,5% NaCl	+	+	+	+
Thermo résistance à 60°C / 30 min.	+	+	+	+
Hydrolyse d'Arginine (ADH)	+	-	+	-
Hydrolyse d'Esculine	-	-	+	+
Citratase	+	+	+	+
Fermentation des sucres	Glucose	+	-	+
	Raffinose	+	-	+
	Lactose	+	+	+
	Cellubiose	+	-	+
	Mannitol	+	-	+
	Arabinose	+	-	+
	Xylose	+	-	+

3- Caractérisation préliminaire ou pré-identification des isolats du lait de chamelle :

A partir des résultats des différents tests macroscopiques, microscopiques et physiologiques effectués sur les quatre isolats lactiques, Une caractérisation préliminaire ou une pré-identification a été faite suivant les recommandations de Carr *et al* (2002) (**Figures : 24, 25, 26**) :

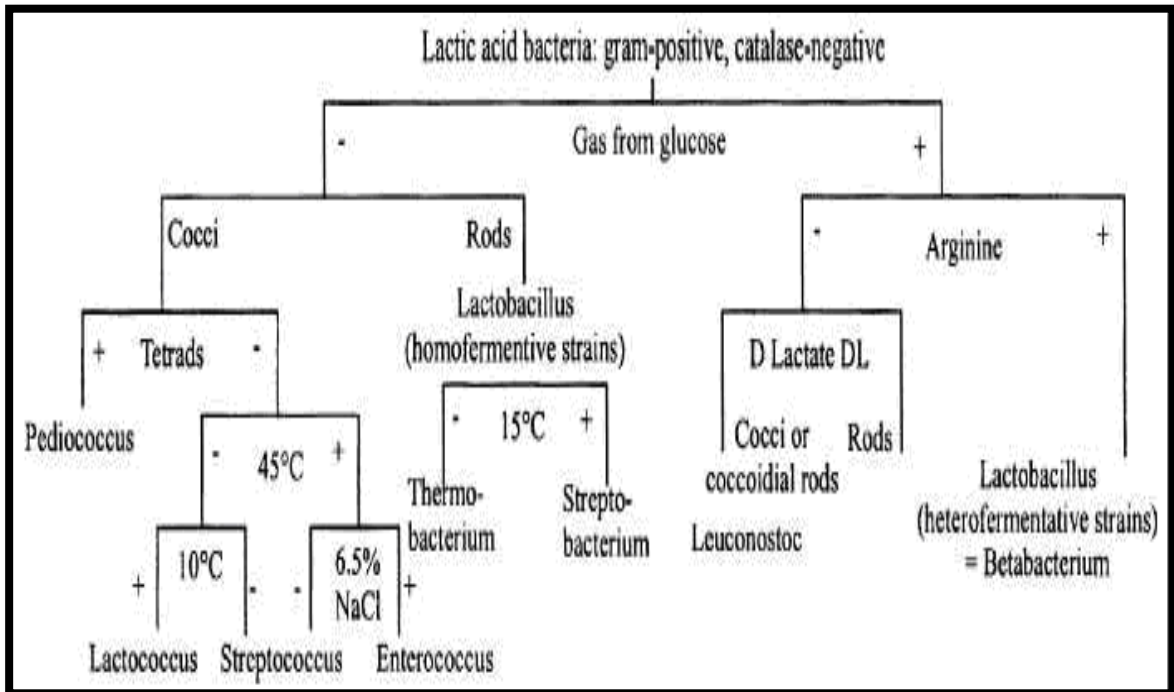


Figure 24: Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et al., 2002).

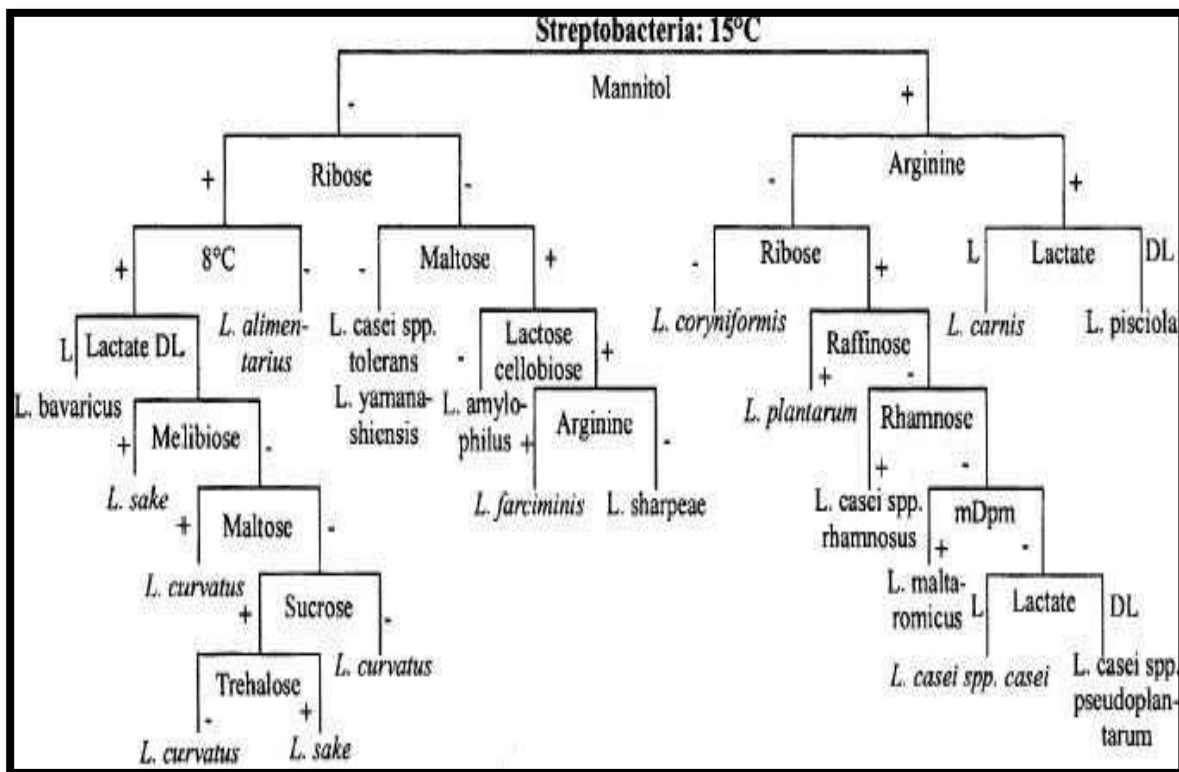


Figure 25: Schéma général d'identification rapide des Streptobacterium (Carr et al., 2002).

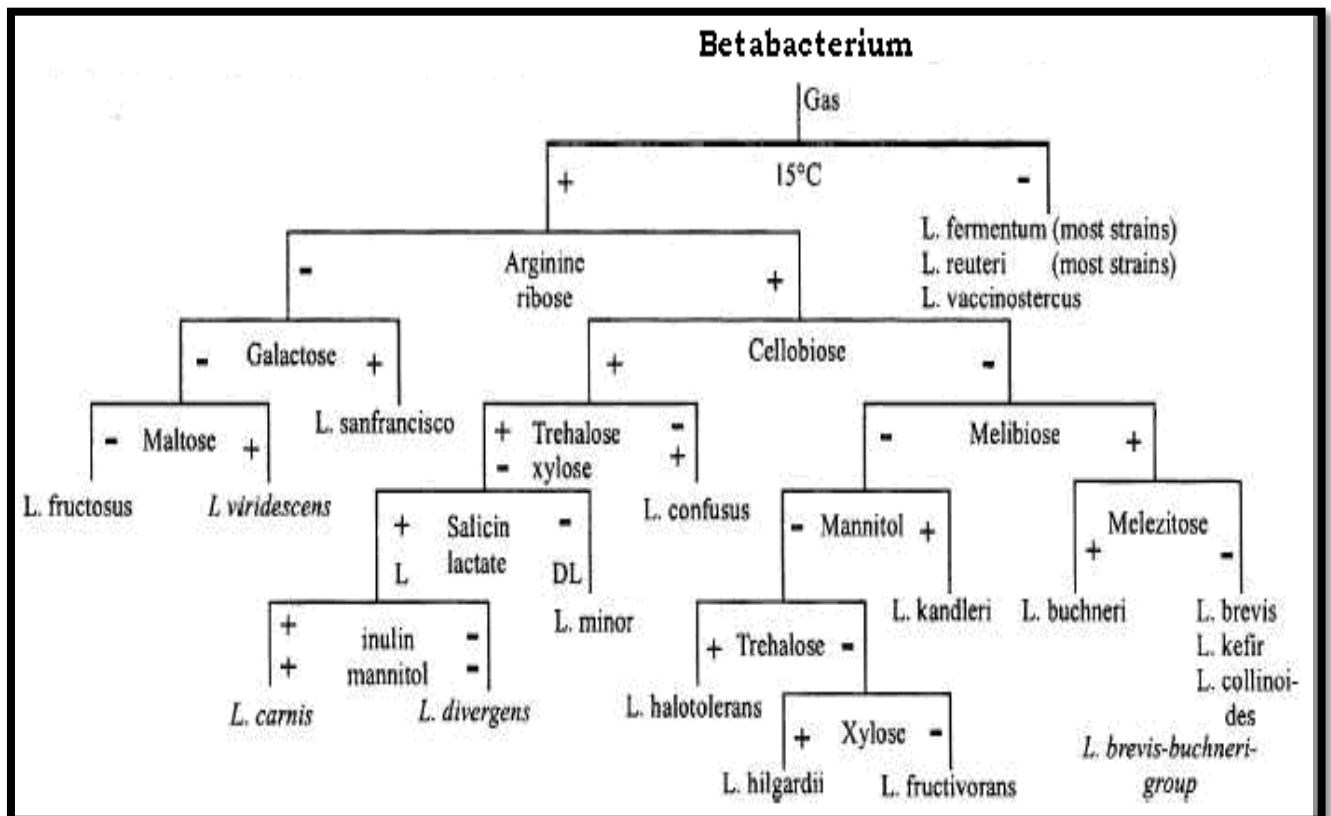


Figure 26: Schéma d'identification rapide des lactobacilles hétéro-fermentatifs « *Bétabacterium* » (Carr *et al.*, 2002).

A partir des résultats des tests macroscopiques, microscopiques et physiologiques et suivant les recommandations de Carr *et al* (2002), on a pu affilier les souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle dans la présente étude au genre *Lactobacillus*.

Les quatre lactobacilles Gram positive et catalase négative isolés sont représentés par Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 dans cette étude.

Les souches Lb2, Lb4 se développent à 45°C mais pas à 10°C, ne produisent pas du CO₂ lors de la fermentation du glucose (homofermentaires), elles sont classées parmi le groupe *Thermobacterium*.

Tandis que la souche Lb3 est mésophile, elle se développe à 10°C. Elle ne produit pas le CO₂ en fermentant le glucose (homofermentaire). Elle est classée dans le groupe des *Streptobacterium*.

La souche Lb1 se développe à 45°C mais pas à 10°C, elle produit du CO₂ lors de la fermentation du glucose (hétérofermentaire stricte), elle est classée dans le groupe Bétabacterium.

Selon Carr *et al* (2002) ; Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006), la distinction des espèces est basée sur d'autres tests physiologiques et biochimiques à savoir : l'hydrolyse d'arginine, l'hydrolyse d'esculine, l'hydrolyse du citrate, la croissance à différentes concentrations (%) en NaCl (**Figure 27**).

Les quatre lactobacilles présentent la capacité de croître en présence de 6,5% de NaCl.

Lb1 :

La souche Lb1 hydrolyse l'arginine et le citrate mais n'hydrolyse pas l'esculine. Elle se rapproche de l'espèce « *Lactobacillus fermentum* ».

Lb2 :

La souche Lb2 n'hydrolyse ni l'arginine ni l'esculine. Elle hydrolyse le citrate. Elle se rapproche de l'espèce « *Lactobacillus helveticus* ».

Lb3 :

La souche Lb3 hydrolyse l'arginine, l'esculine, et le citrate. Elle se rapproche de l'espèce « *Lactobacillus plantarum* ».

Lb4 :

La souche Lb4 hydrolyse l'esculine et le citrate, et n'hydrolyse pas l'arginine. Elle se rapproche de l'espèce « *Lactobacillus acidophilus* ».

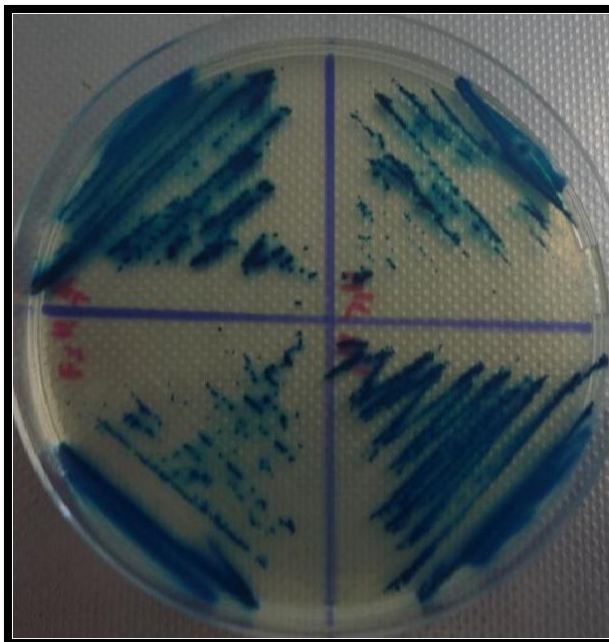
L'identification selon les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques a permis de mettre en place une collection représentée par quatre espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 27: Résultats des tests physiologiques et biochimiques des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle : (a) Type fermentaire ; (b) Hydrolyse de l'arginine ; (c) Hydrolyse du citrate ;(d) Croissance en présence de 6.5% de NaCl.

4-Identification des isolats du lait de chamelle par les galeries API 50CH :

Les quatre isolats pré-identifiés par les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été testés pour leur capacité fermentaire sur 49 tests biochimiques constituant les galeries API 50 CH.

On recherche dans chaque tube l'acidification produite suite à la fermentation du sucre contenu dans le tube qui se traduit par un changement de couleur et le virage du bleu vers le jaune du pourpre de bromocrésol (l'indicateur de pH contenu dans le milieu). Pour le test esculine (tube 25), on observe un virage du pourpre au noir.

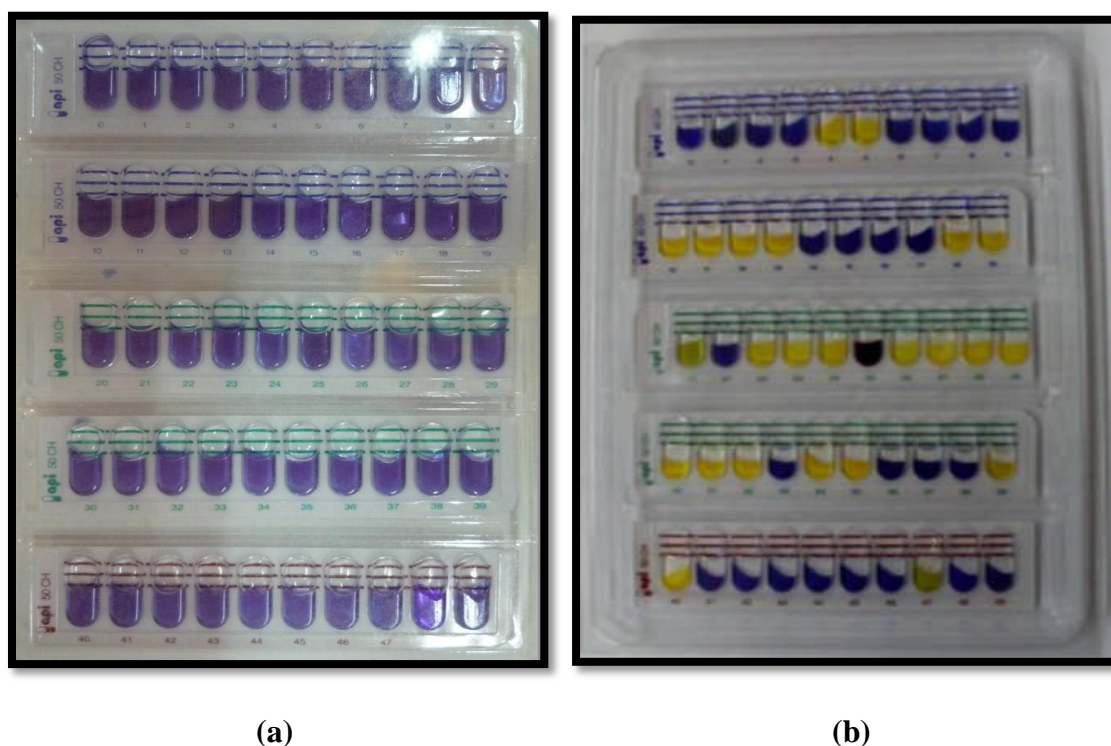


Figure 28: Profils fermentaires de la souche *Lb.plantarum* : (a) Avant l'incubation (b) Après l'incubation.

Les profils fermentaires des quatre souches lactiques obtenus par les galeries API 50 CH sont répertoriés dans le (Tableau 18).

Tableau 18: Profils fermentaires des quatre souches lactiques isolées sur les galeries API 50 CH

Les sucres fermentés	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4
Glycerol	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
l-Arabinose	+	-	+	-
Ribose	+	-	+	-
d-Xylose	+	-	-	-
l-Xylose	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
β -Methyl-xylopyranoside	-	+	-	-
Galactose	+	+	+	-
d-Glucose	+	+	+	+
d-Fructose	+	+	+	+
d-Mannose	-	-	+	+
l-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Mannitol	-	-	+	-
Sorbitol	-	-	+	-
α -Methyl-d-mannoside	-	-	+	-
α -Methyl-d-glucoside	-	+	-	-
N-Acetyl glucosamine	-	-	+	-
Amygdalin	-	-	+	-
Arbutin	-	-	+	-
Esculin	-	-	+	+
Salicin	-	-	+	+
Cellobiose	-	+	+	+
Maltose	-	+	+	-
Lactose	+	-	+	-
Melibiose	-	-	+	-
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	-	-	+	-
Inulin	-	-	-	-
Melezitose	-	-	+	-
d-Raffinose	-	-	+	-
Starch	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-
β -Gentiobiose	-	-	+	-
d-Turanose	-	-	+	-
d-Lyxose	-	-	-	-
d-Tagatose	-	-	+	-
d-Fucose	-	-	-	-
l-Fucose	-	-	-	-
d-Arabitol	-	-	-	-
l-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	-	+	-
2-Keto-gluconate	-	-	-	-
5-Keto-gluconate	-	-	-	-

Les résultats de fermentation des hydrates de carbone sur les galeries API50 CH confirment les résultats des tests précédents (morphologiques, physiologiques et biochimiques) et montrent que les souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle appartiennent aux espèces suivantes : *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* qui sont représentées par Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 respectivement.

Cette identification a été effectuée et renforcée en faisant une comparaison des profils fermentaires obtenus pour les quatre souches lactiques isolées avec les profils fermentaires des espèces de références (ATCC) fournis par la base de données « Apiweb », Biomérieux, France, avec des pourcentages de similitude très élevés.

Ces galeries classiques API 50 CH ont été utilisées pour différencier 15 isolats du genre *Lactobacillus* des 112 isolats lactiques issus du lait de chamelle dans les travaux d'Alaoui *et al.*, (2016). Ces lactobacilles appartenaient aux espèces: *L. Brevis*, *L.delbrueckii* et *L.Fermentum*.

Plusieurs études (Axelsson, 2004 ; An *et al.*, 2004) ont rapporté qu'à chaque fois qu'on compare entre l'identification classique et moléculaire, on trouve que l'identification classique est fiable pour l'étude de la majorité des espèces de bactéries lactiques. Et en perspectives, on estime identifier les souches lactiques isolées par les méthodes moléculaires (le séquençage de l'ADNr 16S) pour confirmer les résultats.

Il n'y avait pas assez de recherches concernant l'isolement des bactéries lactiques à partir de ce lait dans la littérature, mais il existe d'autre part des travaux ayant portés sur le lait de vache et de chèvre.

Semblables à nos résultats, *L. fermentum* (Lb1) isolée dans cette étude était parmi les lactobacilles isolés du lait cru de chamelle dans les travaux d'Abdessemed et Bitam (2013), (Khandelwal *et al.*, (2015); Alaoui *et al.*, (2016).

L. helveticus (Lb2) et *L.acidophilus* (Lb4) ont été isolés à partir du lait cru de chèvre dans les travaux de Badis *et al.*, (2005).

L'isolement de *L.Plantarum* (Lb3) à partir du lait cru de chèvre et de chamelle a été déjà décrit dans plusieurs études notamment celles de (Guessass et Kihal., 2004 ; Badis *et al.*, 2004 ; Boumehira, 2011 ; Mami, 2013).

III- L'étude des propriétés technologiques des Lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle :

Les principales fonctions technologiques d'une souche dite « performante » étant son pouvoir acidifiant, son activité protéolytique, son pouvoir aromatisant, sa stabilité thermique (Thermorésistance) ainsi que ses activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altérations. (Cogan *et al.*, 1997).

Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait. Lairini *et al.*, (2014)

La caractérisation technologique des bactéries lactiques conduit au développement de nouvelles souches bactériennes bien définies et avec des caractères spécifiques. Ces dernières remplacent progressivement les mélanges traditionnellement employés en industrie laitière (Crow *et al.*, 1994).

L'évaluation des aptitudes technologiques a mis en évidence l'existence de bonnes fonctionnalités technologiques chez les lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle dans la présente étude.

Les résultats technologiques sont satisfaisants pour une utilisation industrielle : Les souches sont thermorésistantes, elles hydrolysent les caséines du lait, elles produisent des composés aromatiques par l'hydrolyse de citrate et la production d'acetoïne (**Tableau 19**).

Tableau 19: Résultats des tests technologiques des lactobacilles isolés : Thermo-résistance, production d'acetoïne, l'hydrolyse du citrate et de la caséine du lait.

Caractères	Souches			
	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4
Thermo résistance (30min à 60°C)	+	+	+	+
Production d'acetoïne	+	-	+	-
Utilisation du citrate	+	+	+	+
Hydrolyse de la caséine du lait	+	+	+	+

1-La thermorésistance :

Les quatre lactobacilles isolés ont résisté à un chauffage de 30 min à 60° C au bain Marie. Elles sont donc « Thermorésistantes ».

2-Pouvoir aromatisant :

La production des composés aromatiques par les bactéries lactiques est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés.

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (Cholet, 2006).

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, *Lc. lactis* ssp. *lactis biovar. diacetylactis* et *Ln. mesenteroïdes* ssp. *cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers fermentés à savoir : Le diacétyl, l'acetoïne, 2,3-butane-diol et l'acéto-lactate (Raynaud et al., 2003 ; Leroy et De Vuyst, 2004).

D'après nos résultats, Les lactobacilles isolés du lait camelin dans cette étude possèdent un pouvoir aromatisant étant capables d'hydrolyser le citrate en présence de glucose sur « milieu KMK » (**Figure 29 « a »**). Donc elles sont dotées d'un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.

La plupart des composés aromatiques sont issus du métabolisme du citrate : l'acetoïne et le diacétyl sont les plus importants (François et al., 2007).

Les souches lactiques (Lb1 et Lb3) arrivent à produire de l'acetoïne, dont l'apparition de l'anneau rouge à la surface sur milieu Clark et Lubs le témoigne, Alors que les deux autres souches lactiques Lb2 et Lb4 ne le produisent pas (**Figure 29 « b »**).

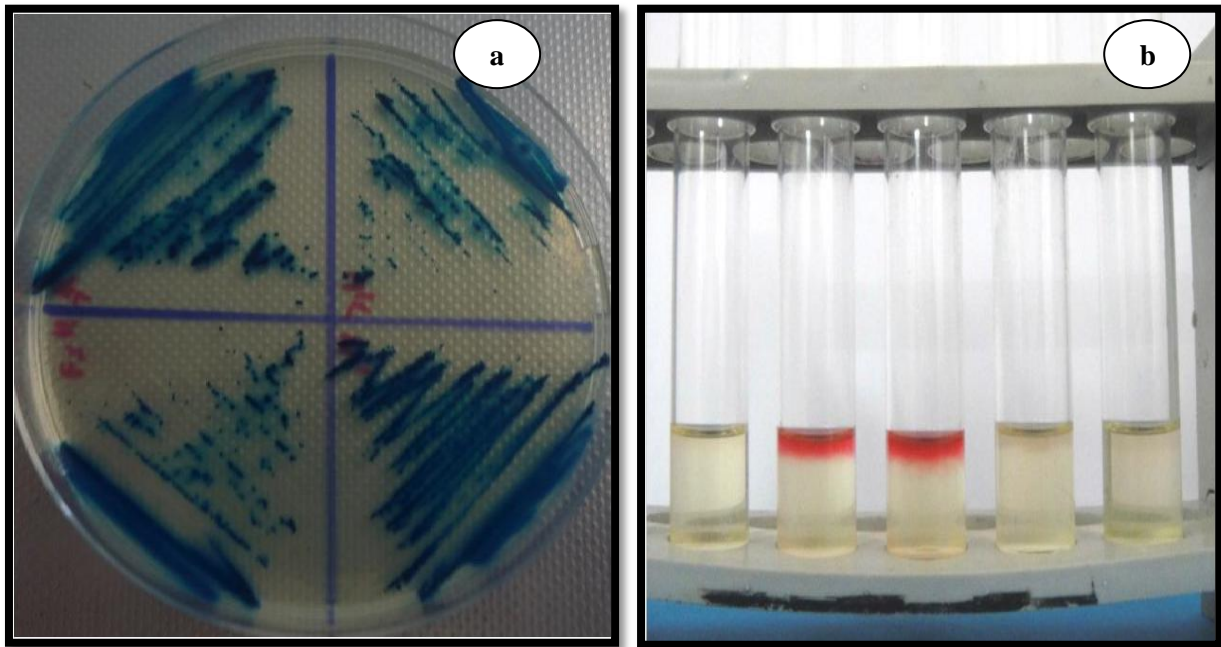


Figure 29: Pouvoir aromatisant des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle :
 (a) : Hydrolyse du citrate, (b) : Production d'acétoïne

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, chez ces bactéries, le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de l'acétate, diacétyl, d'acétoïne, participant aux qualités aromatiques et texturales des produits (Raynaud *et al.*, 2003) (**Figure 30**).

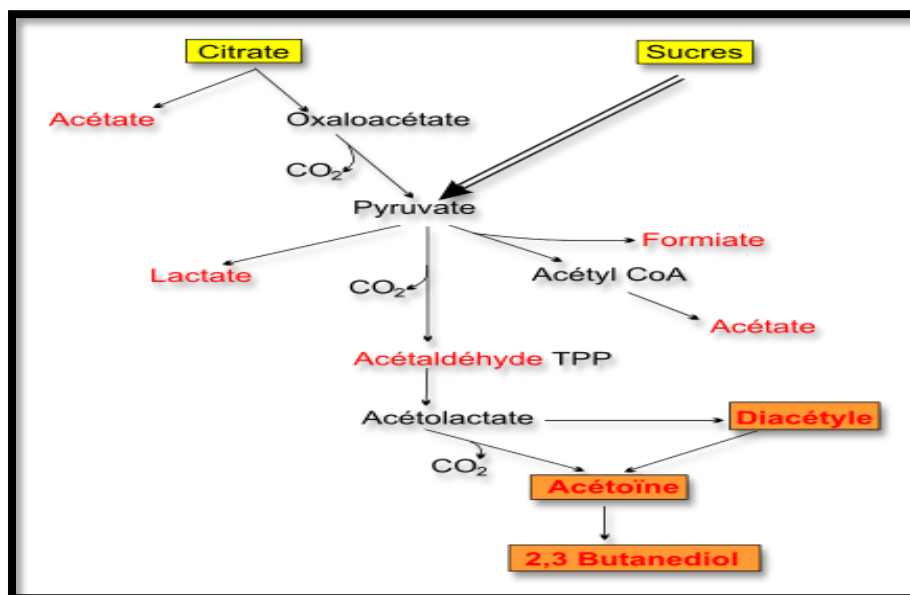


Figure 30 : Les principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques

3- Le pouvoir protéolytique :

L'activité protéolytique est également une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elle leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait, ce milieu étant déficient en sources azotées disponibles. (Thapa *et al.*, 2006), ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (Hassaïne *et al.*, 2007).

Tous les lactobacilles isolés à partir du lait camelin dans cette étude possèdent une activité protéolytique importante étant capables de dégrader les caséines trouvées dans le milieu de culture utilisé. Les résultats de l'activité protéolytique des isolats sont montrés dans la (**Figure 31**).

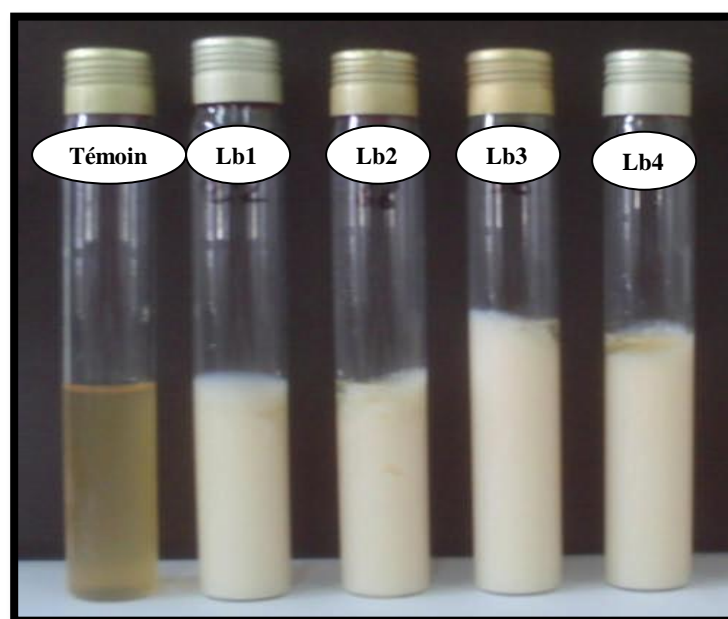


Figure 31: Pouvoir protéolytique des quatre lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle :
Hydrolyse de la caséine du lait

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Idoui et Karam, 2008 ; Hadeif, 2012), qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel et du beurre de chèvre, présentent un caractère protéolytique.

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire. Les peptides issus de la protéolyse sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en acides aminés et en peptides courts (Yvon, 2006).

L'hydrolyse des caséines du lait modifie la texture et les acides aminés et les peptides libérés sont des précurseurs des composés responsables de l'arôme des produits fermentés.

Le comportement protéolytique des souches lactiques est variable d'un milieu à un autre. Ce qui nous permettent de confirmer que cette activité dépend en partie de la composition chimique du milieu de culture (Zadi-Karam, 1998 ; Drici, 2001 ; Hassaine, 2002). D'autres travaux ont démontrés l'existence d'une relation directe entre l'activité protéolytique et la teneur du milieu de culture en peptides libres (Marrug *et al.*, 1995 ; Meijer *et al.*, 1996).

Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les souches très protéolytiques ne sont pas toujours les plus appropriées pour servir comme ferments lactiques.

Une protéolyse excessive peut entraîner la production incontrôlée de peptides amers et autres composés indésirables (Buffa *et al.*, 2005).

Le mécanisme de coagulation du lait par des bactéries lactiques peut être provoqué soit par un système enzymatique c'est-à-dire par des enzymes protéolytiques qui ont la propriété de coaguler le lait (pouvoir protéolytique); soit par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique provoquant l'abaissement du pH et la coagulation du lait (Pouvoir acidifiant).

4 -Pouvoir acidifiant :

L'un des critères technologiques les plus puissants en technologie laitière chez les bactéries lactiques, c'est leur capacité à produire l'acide lactique (Hassaine, 2013). Car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme agent coagulant et antimicrobien.

En pratique, il convient de prendre en considération deux aspects dans la production d'acide lactique : la vitesse d'acidification et le niveau maximal de production car la différence dans la réduction du pH et dans la production d'acides entre les genres, les espèces et parfois entre les souches d'une même espèce a été soulevée par de nombreux auteurs (Luquet et Corrieu, 2005).

L'étude de la cinétique de croissance des quatre souches lactiques a été réalisée sur milieu lait écrémé (à pH=6,62). Des prélèvements stériles ont été effectués périodiquement (chaque 2 heures) afin d'évaluer la croissance bactérienne en faisant des dénombrements bactériens sur milieu MRS solide (**Figure32**).

La vitesse de croissance est estimée par le calcul de la pente de la droite de régression de la courbe de croissance de chaque souche entre $T = 0$ et $T = 48$ h. Le taux de croissance est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\text{Taux de croissance } (\mu) = \frac{\log N_n - \log N_0}{t \times \log 2}$$

Le temps de génération (G) : C'est le temps de doublement moyen de la population.

$$(G) = \frac{1}{\mu}$$

La cinétique d'acidification a été étudiée par le suivi de l'évolution du pH durant l'incubation à l'aide d'un pH mètre et le suivi de l'évolution de l'acidité Dornic dans le milieu en dosant périodiquement (chaque 2 heures) la quantité d'acide lactique produite par chaque souche lactique dans le lait par titrimétrie.

Les vitesses d'acidification et de production d'acide lactique de chaque souche lactique étudiée sont estimées par le calcul de la pente de la droite de régression de la courbe de variation du pH et d'acidité Dornic.

Les différents résultats obtenus sont illustrés dans la figure 32. Les résultats chiffrés de la croissance bactérienne et de l'évolution du pH et d'acidité Dornic sont résumés dans **l'annexe III**.

4- 1-Résultats de la cinétique de croissance et de l'acidification dans le lait écrémé à 30°C :

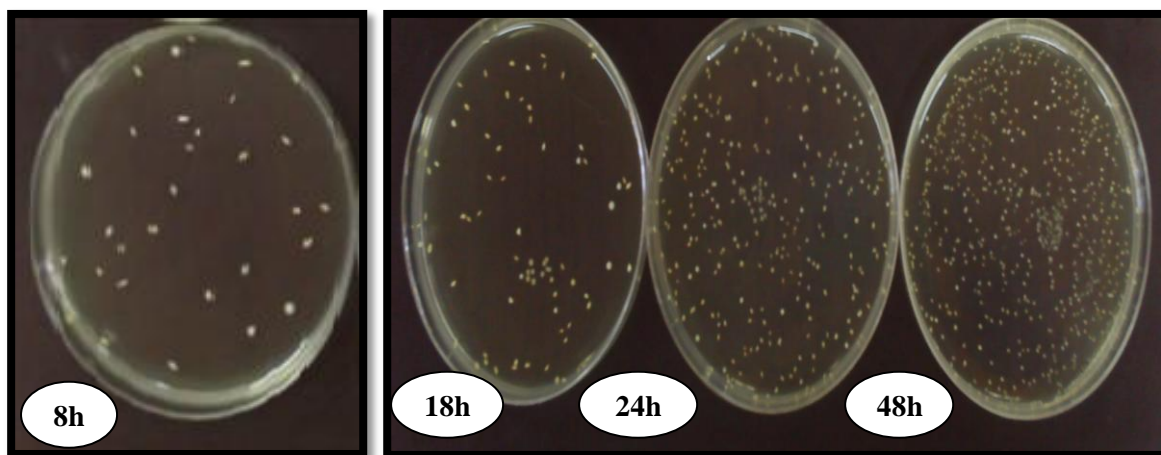


Figure 32 : La croissance des souches lactiques sur milieu MRS solide durant 48h d'incubation à 30°C.

D'après nos résultats montrés dans la (**Figure 33**), on remarque que la charge bactérienne pour chaque souche lactique étudiée (Lb1, Lb2, Lb3, Lb4) a augmenté progressivement dans le milieu lait écrémé (ceci correspond à la phase exponentielle de croissance) jusqu'à atteindre des valeurs maximales différentes selon l'espèce au bout d'environ 48h d'incubation à 30°C (ceci correspond à la phase stationnaire).

Parallèlement, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques étudiées présentent une production progressive d'acide lactique accompagnée d'un abaissement du pH due à la fermentation du lactose du lait par ces souches afin d'assurer leur croissance et leur survie dans le milieu.

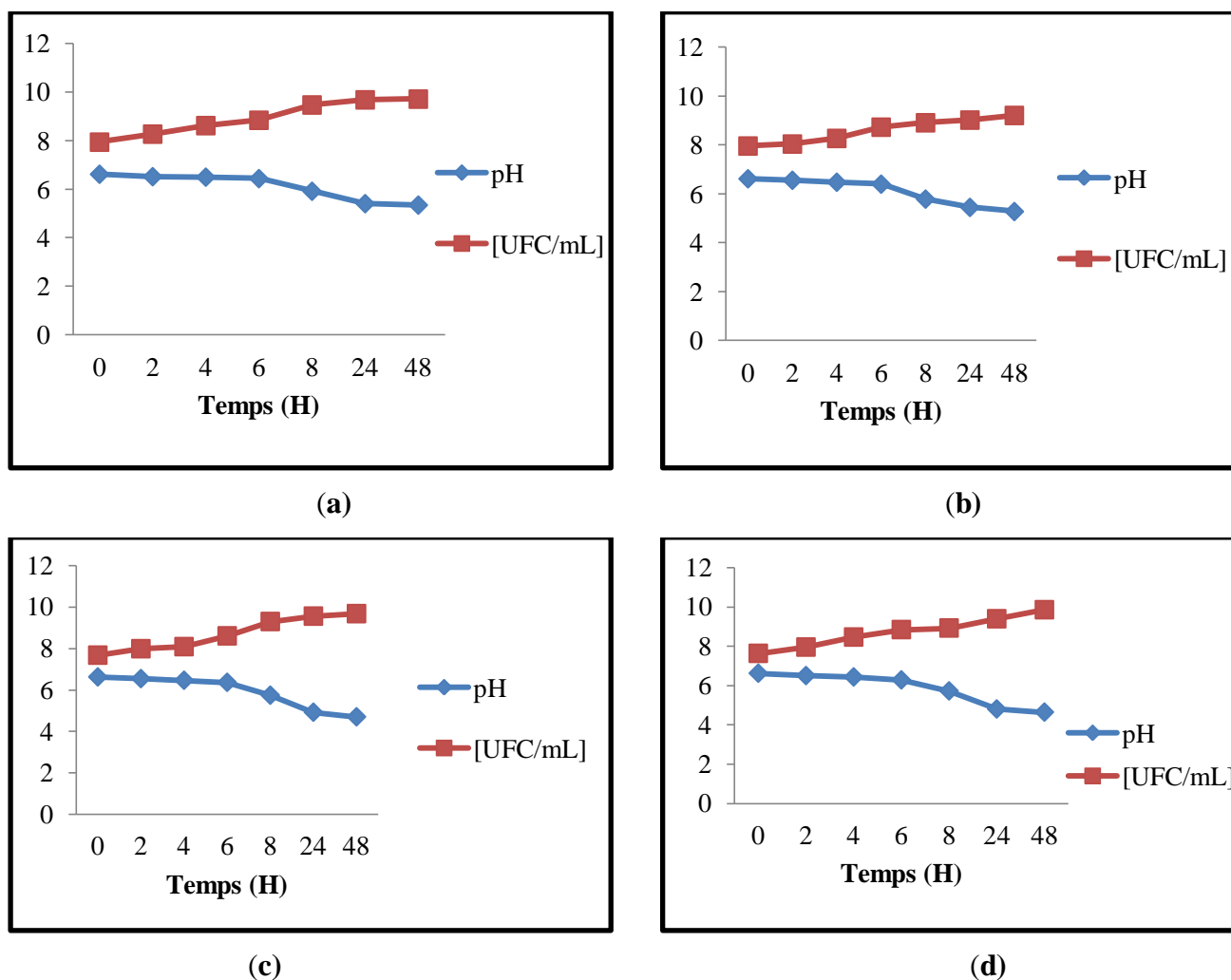


Figure 33 : Cinétique de croissance et d'acidification des quatre souches lactiques du genre *Lactobacillus* dans le milieu lait écrémé à 30°C

a: *L.fermentum* ; b : *L. helveticus*; c: *L.plantarum*; d: *L.acidophilus*.

➤ **Lb1 « *Lactobacillus fermentum* » :**

La concentration initiale de la souche était de 7,94 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. L'analyse de régression fournit une valeur de 0,04 unité de Log₁₀ UFC par h (soit un taux de croissance de 0,13 h⁻¹, et un temps de génération de 460 min environ). La concentration maximale atteinte après 48 h était de 9,71 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. La souche Lb1, acidifie le milieu avec une vitesse de -0,026 unité de pH par heure, et produit de l'acide lactique avec une vitesse de 0,93 mM/h.

➤ **Lb2 « *Lactobacillus helveticus* » :**

La concentration initiale de la souche était de 7,96 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. L'analyse de régression fournit une valeur de 0,03 unité de Log₁₀ UFC par h (soit un taux de croissance de 0,1 h⁻¹, et un temps de génération de 600 min environ). La concentration maximale enregistrée après 48 h était de 9,21 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. La souche Lb2, acidifie le milieu avec une vitesse de -0,028 unité de pH par heure, et produit de l'acide lactique avec une vitesse de 0,77 mM/h.

➤ **Lb3 « *Lactobacillus plantarum* » :**

La concentration initiale de la souche était de 7,67 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. L'analyse de régression fournit une valeur de 0,04 unité de Log₁₀ UFC par h (soit un taux de croissance de 0,14 h⁻¹, ou un temps de génération de 428 min environ). La concentration maximale enregistrée après 48 h était de 9,67 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. La souche Lb3, acidifie le milieu par une vitesse de -0,04 unité de pH par heure, et produit de l'acide lactique par une vitesse de 1,16 mM/h.

➤ **Lb4 « *Lactobacillus acidophilus* » :**

La concentration initiale de la souche était de 7,63 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. L'analyse de régression fournit une valeur de 0,05 unité de Log₁₀ UFC par h (soit un taux de croissance de 0,15 h⁻¹, et un temps de génération de 400 min environ). La concentration maximale enregistrée après 48 h était de 9,85 Log₁₀ UFC. mL⁻¹. La souche Lb4, acidifie le milieu avec une vitesse de -0,041 unité de pH par heure, et produit de l'acide lactique avec une vitesse de 1,31 mM/h.

A t₀, l'acidité moyenne du lait est de 19,0 ± 0,5°D alors que le pH est de 6,62 ± 0,01. Après 2 heures d'incubation, des changements très légers dans la valeur du pH ont été observés pour les quatre souches lactiques. Cette phase correspond probablement à la phase de latence, nécessaire à l'adaptation des souches à leur milieu comme cela a été suggéré par Mannu *et al.* (2000).

Après 6 heures d'incubation, les quatre souches lactiques sont légèrement plus acidifiantes, les valeurs d'acidité Dornic respectives sont 22±1°D, 24±0,5°D, 25±1°D, 28±1,5°D et celles du pH sont 6.44 ±0.02, 6.40±0,04, 6.36±0,05, 6.28±0,03. Après 24 heures, il apparaît que la production d'acides responsables de l'abaissement du pH est plus prononcée.

Ces résultats sont en concordance avec les résultats trouvés par Cogan (1981), Novel (1993) et Champagne *et al.*, (2000).

4- 2-Comparaison de la cinétique de croissance et d'acidification des quatre souches dans le milieu lait écrémé :

A partir des différentes cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les quatre souches lactiques du genre *Lactobacillus* présentent des profils cinétiques similaires (**Figure 34**).

Le taux de croissance des quatre souches lactiques Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 dans le lait écrémé est égal en moyenne à $0,13 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

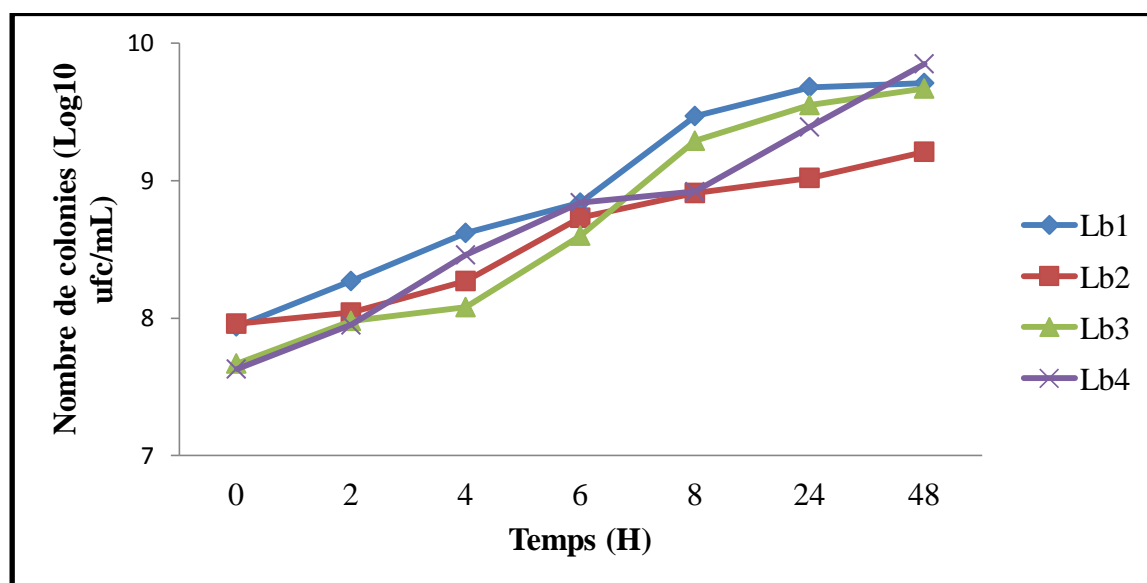


Figure 34 : Cinétique de croissance dans le lait écrémé à 30°C les quatre souches lactiques.

La totalité des bactéries lactiques testées a présenté une production progressive d'acide lactique due à la fermentation du lactose afin d'assurer leur croissance et leur survie dans le milieu. Le pH a évolué de façon inverse à la quantité d'acide lactique produite.

Les quatre lactobacilles Lb1, Lb2, Lb3, Lb4 présentent des vitesses d'acidification différentes, qui égalent à $-0,033 \pm 0,007$ unité de pH par heure en moyenne, et produisent de l'acide lactique avec une vitesse moyenne de $1,04 \pm 0,24 \text{ mM/h}$.

Selon Cogan et al. (1997), Les bactéries lactiques acidifiantes sont celles qui sont capables de réduire le pH du lait à partir de sa valeur initiale d'environ 6,6 à 5,3.

Cependant, les résultats obtenus après 48 h d'incubation (**Figures 35 et 36**), nous ont permis de classer presque la totalité des souches lactiques testées Lb1, Lb2, Lb3 dans la catégorie des bactéries lactiques acidifiantes avec ($40^{\circ}\text{D} < \text{acidité} < 79^{\circ}\text{D}$) et des pH finaux d'ordre de (5.35, 5.28 et 4.70) respectivement, à l'exception de la souche Lb4 qui s'avère fortement acidifiante ($\text{acidité} \geq 79^{\circ}\text{D}$) (Hassaine, 2013), avec un pH final du lait égal à 4,64 et une production de 8.2 g/L d'acide lactique après 48h d'incubation..

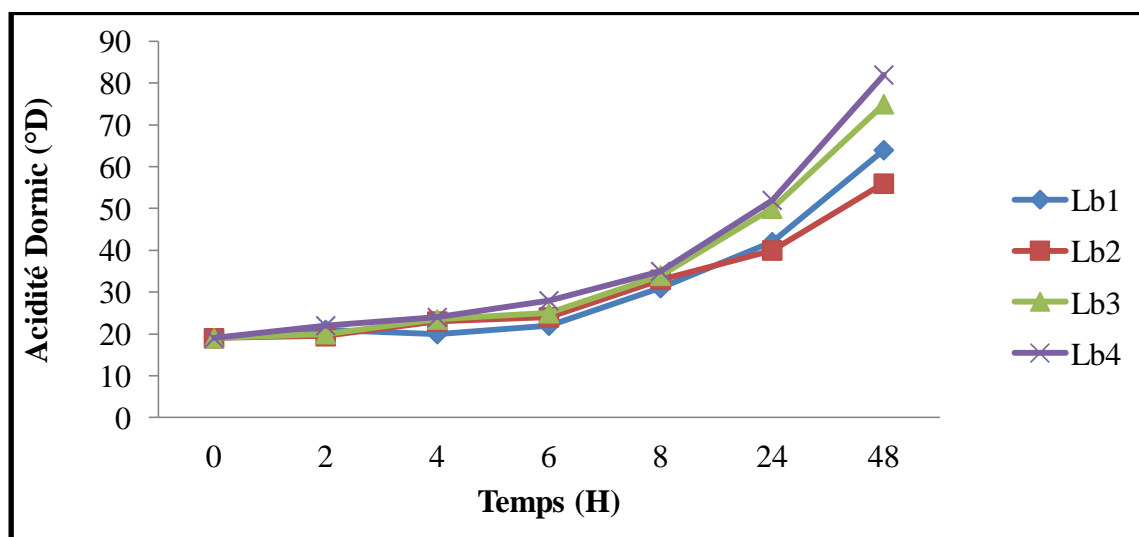


Figure 35 : Cinétique d'acidification du lait écrémé à 30°C par les quatre souches lactiques.

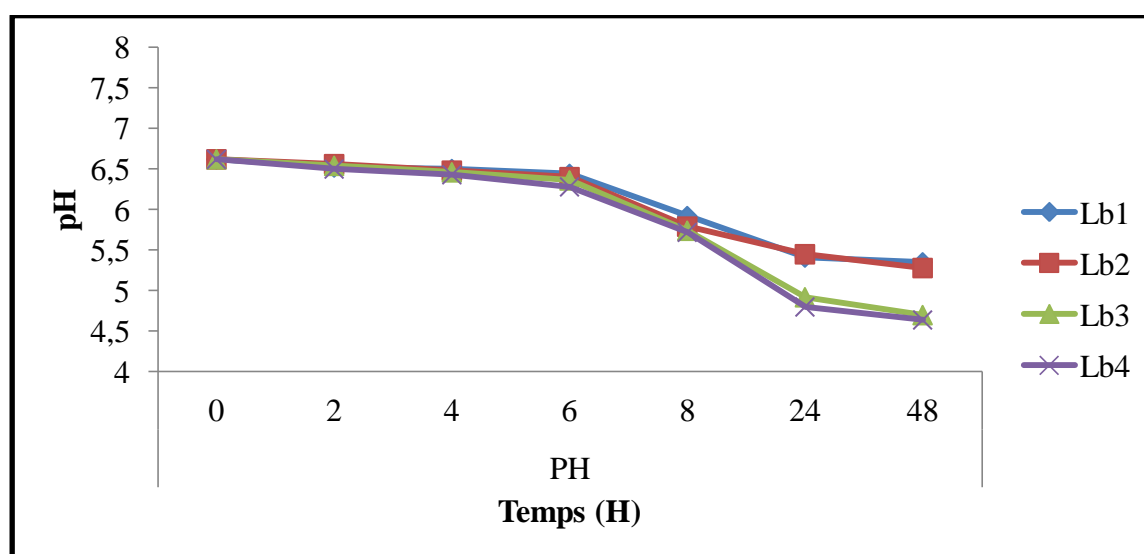


Figure 36 : Evolution du pH des milieux « lait écrémé » à 30°Censemencés par les quatre souches lactiques.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus dans certains travaux ayant étudié l'activité acidifiante des souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* (Xanthopoulos *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 2004; Dagdemir et Ozdemir, 2008).

(Xanthopoulos *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 2004; Dagdemir et Ozdemir, 2008) ont montré également qu'il y a une variation dans les valeurs du pH entre les souches à l'intérieure du même genre et ils ont classé les souches lactiques par rapport à leurs pouvoirs acidifiants en bactéries fortement acidifiantes, moyennement acidifiantes et faiblement acidifiantes.

Ces résultats sont aussi en accord avec ceux signalés par Lairini *et al.*, (2014), qui a rapporté que les lactobacilles sont des souches fortement acidifiantes.

Cette diversité dans l'activité acidifiante offre donc un large choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques.

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle dans cette étude, elle demeure l'une de leurs propriétés métaboliques et technologiques les plus recherchées vu son intérêt dans l'augmentation de la durée de conservation et dans la coagulation et la contribution à la texture des produits fermentés en technologie laitière.

Compte tenu des résultats obtenus, les quatre souches sélectionnées durant cette étude peuvent être proposées pour une éventuelle utilisation comme ferments pour fabriquer des produits de transformation du lait en Algérie, Cette acidification provoque la coagulation du lait, favorise l'égouttage du gel, participe aux qualités organoleptiques des produits transformés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles ou indésirables, Donc on peut considérer que ce paramètre est un élément essentiel pour l'utilisation de ces souches dans l'industrie laitière.

De plus, des associations entre ces souches et d'autres souches lactiques habituelles ou commerciales sont indispensables pour obtenir un produit de qualité organoleptique et nutritionnelle recherchées. (Mami, 2013)

Les souches ayant un profil d'acidification du lait rapide se révèlent comme étant de bonnes candidates pour l'industrie des aliments fermentés, et pourront être utilisées comme cultures

starters. De la même manière, les souches ayant montré un pouvoir d'acidification faible sont utilisées, mais en cultures mixtes, pour d'autres propriétés importantes, par exemple l'activité aromatisante (Hassaine, 2013).

IV- Etude des propriétés antagonistes des lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle vis-à-vis de certains contaminants pathogènes fréquents du lait:

La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur surtout dans la période estivale dans les pays chauds comme l'Algérie.

La pasteurisation, la fermentation et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne.

L'emploi excessif ou non contrôlé des additifs chimiques peut engendrer des risques sur la santé du consommateur.

Actuellement les travaux scientifiques sont axés sur l'exploitation des interactions microbiennes pour réduire d'une façon considérable la présence de microorganismes indésirables.

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bio-conservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes. (Uehara *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish *et al.*, 2011).

Cette partie de l'étude a été inspirée des problèmes rencontrés dans l'industrie laitière et illustre l'importance des activités antimicrobiennes des lactobacilles d'origine cameline vis-à-vis de certains germes pathogènes.

L'activité antibactérienne des lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle *Camelus dromedarius* à l'encontre de six souches pathogènes impliqués souvent dans les cas d'infections et d'intoxications alimentaires à savoir : *S.aureus*, *B.subtilis*, *Ps.aeruginosa*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *S.flexnerii*, a été testée et évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste qui peut servir pour une meilleure bio-préservation des aliments.

1-Mise en évidence du pouvoir antagoniste des lactobacilles isolés du lait de chamelle *in-vitro* :

Notre choix s'est porté sur une technique largement citée dans la littérature, c'est la méthode de diffusion des disques imprégnés décrite par Tadesse *et al.*, (2004).

L'interaction bactérienne ou l'effet antagoniste se manifeste par l'apparition des zones claires et translucides autour des disques imprégnés, dites « zones d'inhibition ».

Plus le diamètre de ces zones d'inhibition est grand plus la souche pathogène est sensible aux substances antimicrobiennes libérées par la souche lactique productrice et plus il est petit, plus la souche est résistante. De ce fait, les bactéries sont classées selon leur sensibilité en trois catégories: Sensibles, intermédiaires et résistantes (Xia *et al.* ,2005).

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure ou égale à 2 mm sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes (Guessas, 2007).

Les différents diamètres des zones d'inhibition enregistrées (en mm) entre les quatre souches lactiques et les six germes pathogènes testés sont récapitulés dans le (**Tableau 20**).

Tableau 20 : Spectre d'action des quatre souches lactiques vis-à-vis des six germes pathogènes testés (Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm).

Souches lactiques	Souche pathogène	Moyenne	Ecart-type	N (nombre de répétitions)
Lb1 <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>S.aureus</i>	12,6667	1,52753	3
	<i>B.subtilis</i>	0,0000	0,00000	3
	<i>S.Enteritidis</i>	10,0000	1,73205	3
	<i>E.coli</i>	5,6667	1,52753	3
	<i>P.aeruginosa</i>	10,0000	1,00000	3
	<i>S.flexnerii</i>	12,3333	0,57735	3
Lb2 <i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>S.aureus</i>	11,0000	2,00000	3
	<i>B.subtilis</i>	8,3333	3,51188	3
	<i>S.Enteritidis</i>	11,0000	2,00000	3
	<i>E.coli</i>	7,6667	1,52753	3
	<i>P.aeruginosa</i>	12,3333	0,57735	3
	<i>S.flexnerii</i>	10,3333	1,52753	3
Lb3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>S.aureus</i>	16,0000	2,00000	3
	<i>B.subtilis</i>	2,0000	2,64575	3
	<i>S.Enteritidis</i>	13,0000	1,73205	3
	<i>E.coli</i>	10,0000	1,00000	3
	<i>P.aeruginosa</i>	11,0000	1,00000	3
	<i>S.flexnerii</i>	14,6667	0,57735	3
Lb4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>S.aureus</i>	10,333	0,57737	3
	<i>B.subtilis</i>	7,3333	0,57735	3
	<i>S.Enteritidis</i>	14,5000	1,32288	3
	<i>E.coli</i>	5,3333	0,57735	3
	<i>P.aeruginosa</i>	12,0000	1,73205	3
	<i>S.flexnerii</i>	11,0000	1,73205	3

D'après les résultats obtenus, on a pu constater que tous les lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle dans cette étude ont montré des activités antibactériennes à l'encontre des souches pathogènes testées, dont les zones d'inhibitions apparentes autour des disques le témoignent (Diamètres ≥ 2 mm), à l'exception de la souche Lb1 qui est inactive uniquement contre *Bacillus subtilis* (absence de zone d'inhibition visible).

Dans un même contexte, plusieurs études récentes ont pu mettre en évidence des activités antimicrobiennes exercées par des bactéries lactique d'origine cameline vis-à-vis de différents germes pathogènes : à titre d'exemple on parle de l'inhibition de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 106510 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 par deux isolats de bactéries lactiques d'origine cameline (BLC3 et BLC9) dans les travaux de Jrad *et al.*, (2013) en Tunisie ainsi que l'inhibition d'un germe pathogène aquatique *Aeromonas veronii* par *Lactobacillus rhamnosus* CMU 14 et *Lactobacillus fermentum* CMU 17 isolés à partir du lait cru de chamelle dans le travail de Khandelwal *et al.*, (2015) en Inde, Ainsi l'inhibition de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* par des espèces du genre *Lactococcus* isolées à partir du lait de chamelle dans le travail de Rahli, (2015) à Bechar.

Ces résultats nous ont conduits à conclure que ces souches lactiques sont caractérisées comme productrices de substances antimicrobiennes capables d'inhiber la croissance des germes indésirables.

Par ailleurs, Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance une multitude de composés antimicrobiens actifs dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes indésirables (Dortu et Thonart, 2009).

Parmi ces métabolites aux propriétés antimicrobiennes on parle des acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H_2O_2), des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (Titiek *et al.*, 1996 ; Aslam et Qazi, 2010).

Ces résultats peuvent expliquer également la longue durée de conservation du lait de chamelle et son intérêt thérapeutique (Hassan *et al.*, 2008).

2- Analyse statistique :

Les essais effectués pour l'estimation des activités antimicrobiennes des bactéries lactiques étudiées vis-à-vis des germes pathogènes testés ont été reproduits en triplicata. L'analyse statistique des données (analyse de la variance au niveau $p=0.05\%$) a été réalisée par le logiciel statistique (SPSS statistics).

➤ Comparaison des effets inter-sujets par combinaison souche lactique-souche pathogène :

Tableau 21: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre *Lactobacillus fermentum* (Lb1) et les six pathogènes testés (DM1): (Test Anova)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	350,444	5	70,089	46,726	0,000

Tableau 22: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre *Lactobacillus helveticus* (Lb2) et les six pathogènes testés (DM2) (Test Anova):

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	47,111	5	9,422	2,232	0,118

Tableau 23: Analyse statistique (Test Anova) des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre *Lactobacillus plantarum* (Lb3) et les six pathogènes testés (DM3) :

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	373,111	5	74,622	27,412	0,000

Tableau 24: Analyse statistique (Test Anova) des différents effets inhibiteurs inter-sujets entre *Lactobacillus acidophilus* (Lb4) et les six pathogènes testés (DM4) :

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	162,625	5	32,525	22,303	0,000

Les quatre lactobacilles isolés ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis de chaque souche pathogène testée. C'est-à-dire que chaque souche lactique a inhibé chacune des pathogènes testées avec des potentiels inhibiteurs différents.

Selon l'étude statistique (l'analyse de la variance « Anova 1 »), ces potentiels inhibiteurs diffèrent significativement pour les souches Lb1, Lb3, Lb4 ($p < 0,05$) à l'exception de la souche lactique Lb2 ou les potentiels inhibiteurs contre les pathogènes testés ont varié d'une façon statistiquement non significative ($p > 0,05$). C'est-à-dire que la souche Lb2 a réagit presque de la même manière vis-à-vis de toutes les bactéries pathogènes testées (diamètres des zones d'inhibition contre les six pathogènes testés avaient des valeurs moyennes proches) (**Tableaux 21, 22, 23, 24**).

Selon Trias *et al.*, (2008), le diamètre des zones d'inhibition varie avec le type de milieu de culture utilisé et l'espèce utilisée comme souche cible ou indicatrice (Souche pathogène).

Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes. Les diamètres des zones d'inhibition révélées, varient de 02 mm (étant la plus faible activité inhibitrice observée chez la souche *L.Plantarum* Lb3 contre *Bacillus substilis*) à 16 mm (étant la plus grande activité inhibitrice observée chez la souche *L.Plantarum* Lb3 contre *S. aureus* (**Tableau 20**).

Nous avons constaté que nos résultats d'antagonisme concordent avec ceux de Boudjani (2009), qui a trouvé que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait cru de vache peuvent atteindre environs 20 mm.

Ces valeurs peuvent coïncident aussi avec les travaux de Bouzid (2008), où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait de chamelle ont été de l'ordre de 11mm jusqu'au 17 mm.

Les diamètres des zones d'inhibition donnés par *L. fermentum* (Lb1) à l'encontre des six pathogènes testés ont varié de 5,6 à 12,66 mm. (Cette fluctuation est statistiquement significative ($p < 0.05$). La plus grande inhibition enregistrée était contre *S. aureus*, alors qu'aucune inhibition n'a été enregistrée contre *Bacillus subtilis*.

Les diamètres des zones d'inhibition enregistrées par *L. helveticus* (Lb2) contre les six pathogènes testés ont varié d'une manière statistiquement non significative ($p > 0.05$) de 7,6 à 12,33 mm. A titre comparatif avec les travaux d'autres chercheurs, *L. helveticus* est actif vis-à-vis d'*E. Coli ATCC 4157* ($Z_i = 7,6\text{mm}$) par rapport aux résultats obtenus par Allouche *et al.*, (2010) ou *L. helveticus* était inactif vis-à-vis d'*E. Coli ATCC 105331*.

Pour *L. acidophilus* (Lb 4), les diamètres des zones d'inhibition enregistrés vis à vis des six pathogènes testés ont varié de 5,3 à 14,5 mm, cette variation est statistiquement significative ($p < 0.05$). La plus grande inhibition était contre *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076).

Dans des études similaires, Lin *et al.*, (2007) ; Karska- Wysocki *et al.*, (2010) ont rapporté que les bactériocines produites par *L. acidophilus* développent une activité positive vis-à-vis de *Salmonella choleraesuis* . Et dans le travail d'Allouche *et al.*, 2010 , *Staphylococcus aureus 209p* et *Pseudomonas aeruginosa 165* ont été les souches les plus sensibles à l'action de *L. Acidophilus* avec ($Z_i = 22\text{mm}$), Alors qu'aucune inhibition n'a été observée contre *Salmonella seftenberg 67*.

Plusieurs auteurs ont déjà montré que *L. acidophilus* produisait une substance inhibitrice agissant contre les bactéries pathogènes (Nijatu *et al.*, 2015).

L. Plantarum (Lb3) a montré la plus grande zone d'inhibition contre *S. aureus* ($Z_i = 16\text{mm}$) et la plus faible zone d'inhibition contre *B. subtilis* (2mm) cette différence d'inhibition vis-à-vis des pathogènes testés est statistiquement significative ($p < 0.05$). L'inhibition de *S. aureus* et *E. coli* par *L. Plantarum* isolée du lait de chèvre a été déjà décrite par (Mami *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2004; Karthikeyan et santosh., 2009).

Karthikeyan et Santosh (2009), ont décrit des souches de *Lactobacillus plantarum* qui inhibent les souches de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi, *Klebsiella sp* et *Pseudomonas aeruginosa*.

➤ **Comparaison des effets intra-sujets par paire « souche lactique-souche lactique » :**

Tableau 25 : Analyse statistique des différents effets inhibiteurs « intra-sujets » entre les quatre souches lactiques étudiées (Comparaison souche lactique- souche lactique) (Analyse de la variance).

(I) Bactérie lactique	(J) Bactérie lactique	Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance de la différence à 95%	
					Borne inférieure	Limite supérieure
Lb1	Lb2	-1,667*	0,524	0,003	-2,721	-0,612
	Lb3	-2,667*	0,524	0,000	-3,721	-1,612
	Lb4	-1,639*	0,524	0,003	-2,693	-0,584
Lb2	Lb1	1,667*	0,524	0,003	,612	2,721
	Lb3	-1,000	0,524	0,063	-2,055	0,055
	Lb4	0,028	0,524	0,958	-1,027	1,082
Lb3	Lb1	2,667*	0,524	0,000	1,612	3,721
	Lb2	1,000	0,524	0,063	-0,055	2,055
	Lb4	1,028	0,524	0,056	-0,027	2,082
Lb4	Lb1	1,639*	0,524	0,003	0,584	2,693
	Lb2	-0,028	0,524	0,958	-1,082	1,027
	Lb3	-1,028	0,524	0,056	-2,082	0,027

La variable dépendante: C'est le diamètre moyen des zones d'inhibition enregistrées.

(*) : La différence des moyennes est significative au niveau 0,05.

Les potentiels inhibiteurs enregistrés vis-à-vis de l'ensemble des germes pathogènes testés ont varié d'une souche lactique à une autre.

Selon les résultats de l'étude statistique (L'analyse de la variance, SPSS) (**Tableau 25**), il s'est avéré que diamètres des zones d'inhibition (potentiels inhibiteurs) enregistrés vis-à-vis des six pathogènes testés ont varié d'une façon statistiquement non significative ($p > 0,05$) entre les trois souches lactiques Lb2, Lb3 et Lb4. C'est à dire que les trois souches du genre *Lactobacillus*

Lb2, Lb3 et Lb4 présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis des germes cibles testés. Tandis que les potentiels inhibiteurs vis-à-vis des six pathogènes diffèrent très significativement ($p < 0.05$) entre la souche lactique Lb1 et le reste des lactobacilles (Lb2, Lb3, Lb4). C'est-à-dire que la souche lactique Lb1 se comportait différemment vis à vis des pathogènes testés par rapport aux autres souches lactiques : Lb2, Lb3, Lb4.

La diversité dans l'activité acidifiante entre les souches lactiques peut être à l'origine des variations dans leur activité antimicrobiennes.

Ces variations peuvent s'expliquer aussi par la quantité et la variabilité structurelle des bactériocines produites par ces bactéries lactiques (Richard *et al.*, 1996). Cependant, la résistance de *B.subtilis* à *L.fermentum* témoignée par l'absence de zone d'inhibition nous incite à penser aussi que la quantité des bactériocines produite par *L.fermentum* est trop faible pour permettre de visualiser une inhibition (Dalache, 2006).

La production des bactériocines est influencée par plusieurs facteurs qui sont principalement : la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu (Dortu et Thonart, 2009).

La production des bactériocines est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (Héquet *et al.*, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed *et al.*, 2010). Alors que la production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* était optimale à 37°C et à pH : 6 (Xie *et al.*, 2011).

Selon les résultats rapportés par Tadesse *et al.*, 2005, L'inhibition était significativement plus élevé contre *S. aureus* et *E. coli* O157: H7 lorsque *Lactobacillus* a été cultivé dans le bouillon LAPTg que dans le bouillon MRS ($p < 0,05$).

➤ Comparaison des effets intra-sujets par paire « souche pathogène-souche pathogène » :

Tableau 26: Analyse statistique des différents effets inhibiteurs intra-sujets entre les six souches pathogènes testées (Comparaison souche pathogène-souche pathogène) (Analyse de la variance) :

(I) Bactérie pathogène	(J) Bactérie pathogène	Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig.
<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	8,083 [*]	0,642	0,000
	<i>S.Enteritidis</i>	0,375	0,642	0,562
	<i>E.coli</i>	5,333 [*]	0,642	0,000
	<i>P.aeruginosa</i>	1,167	0,642	0,076
	<i>S.flexnerii</i>	0,417	0,642	0,520
<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	-8,083 [*]	0,642	0,000
	<i>S.Enteritidis</i>	-7,708 [*]	0,642	0,000
	<i>E.coli</i>	-2,750 [*]	0,642	0,000
	<i>P.aeruginosa</i>	-6,917 [*]	0,642	0,000
	<i>S.flexnerii</i>	-7,667 [*]	0,642	0,000
<i>S.Enteritidis</i>	<i>S.aureus</i>	-0,375	0,642	0,562
	<i>B.subtilis</i>	7,708 [*]	0,642	0,000
	<i>E.coli</i>	4,958 [*]	0,642	0,000
	<i>P.aeruginosa</i>	0,792	0,642	0,224
	<i>S.flexnerii</i>	0,042	0,642	0,949
<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	-5,333 [*]	0,642	0,000
	<i>B.subtilis</i>	2,750 [*]	0,642	0,000
	<i>S.Enteritidis</i>	-4,958 [*]	0,642	0,000
	<i>P.aeruginosa</i>	-4,167 [*]	0,642	0,000
	<i>S.flexnerii</i>	-4,917 [*]	0,642	0,000
<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	-1,167	0,642	0,076
	<i>B.subtilis</i>	6,917 [*]	0,642	0,000
	<i>S.Enteritidis</i>	-0,792	0,642	0,224
	<i>E.coli</i>	4,167 [*]	0,642	0,000
	<i>S.flexnerii</i>	-0,750	0,642	0,249
<i>S.flexnerii</i>	<i>S.aureus</i>	-0,417	0,642	0,520
	<i>B.subtilis</i>	7,667 [*]	0,642	0,000
	<i>S.Enteritidis</i>	-0,042	0,642	0,949
	<i>E.coli</i>	4,917 [*]	0,642	0,000
	<i>P.aeruginosa</i>	0,750	0,642	0,249

(*) : La différence des moyennes est significative au niveau 0,05.

D'après ces résultats on a pu remarquer que parmi les six pathogènes testés dans cette étude, *B.subtilis* et *E.coli* ont été les souches pathogènes les moins inhibées ou bien les plus résistantes à l'action des quatre souches lactiques étudiées avec des potentiels inhibiteurs significativement différents par rapport aux autres pathogènes testés (**Tableau 26**).

Selon Rochelle *et al.*, (1996), Certains micro-organismes pathogènes sont capables de s'adapter très rapidement face à certains stress (stress acides très sévères, rayonnement UV, chaleur) et face à des molécules toxiques auxquelles elles sont confrontées dans leur environnement (métaux lourds, substances antimicrobiennes sécrétées par des animaux, plantes, bactéries ou champignons pour leur propre défense...) grâce à un ensemble de mécanismes géniques intrinsèques de résistance à savoir les mutations (modification des sites de fixation de la substance antimicrobienne (bactériocine) et/ou la réduction de la perméabilité cellulaire par la fermeture des pores membranaires par lesquels pénètre la substance antimicrobienne dans la cellule).

Plusieurs auteurs ont suggéré qu'un changement des propriétés de perméabilité de la membrane externe suite à certaines conditions de stress rendraient certaines bactéries pathogènes résistantes aux bactériocines (Abee *et al.*, 1994; Deegan *et al.*, 2006).

Il a été également noté que la sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce .Ces variations de sensibilité sont dues aux caractéristiques des souches (Présence ou absence de site récepteur) et donc aux niveaux de lésions occasionnés par le facteur inhibiteur (Mami, 2013).

La connaissance de l'organisation génétique, de la régulation et des relations structure-fonction des bactériocines pourra permettre de pallier ces problèmes par la mise en place de procédés antibactériens plus efficaces.

Finalement, la connaissance du mode d'action des bactériocines est essentielle afin d'optimiser l'effet antagoniste de ces dernières et de limiter l'apparition de souches résistantes (Richard, 1996).

Il y a aussi des rapports qui indiquent que certains micro-organismes produisent un système de réponse à la tolérance à l'acide qui les protège contre le stress acide sévère pendant de plus longues périodes (Foster & Hall, 1991).

E. coli est plus tolérant à certains acides organiques que beaucoup d'autres pathogènes infectieux et peut survivre bien dans les aliments acides et les boissons (Rochelle, Clavero, et Beuchat, 1996).

La capacité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes *in vitro* semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor et al., 2006).

La réduction des cas d'intoxications alimentaires dues aux germes nuisibles peut se réaliser par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques capables de produire des substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne.

Cette approche a été déjà soulignée par Topisirovic et al., (2006) en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles de *Lactobacillus helveticus* dans la bio préservation des aliments et la réduction des germes de contamination.

Ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives intéressantes pour lutter contre les intoxications alimentaires en utilisant des potentialités biologiques et les interactions entre les microorganismes afin de réduire ainsi l'effet secondaire indésirable des produits chimiques appelés conservateurs.

Les lactobacilles isolés à partir du lait de chamelle *Camelus dromedarius* qui synthétisent des substances antimicrobiennes, seront utilisées comme un moyen efficace dans la bio-préservation des aliments dans le futur proche.

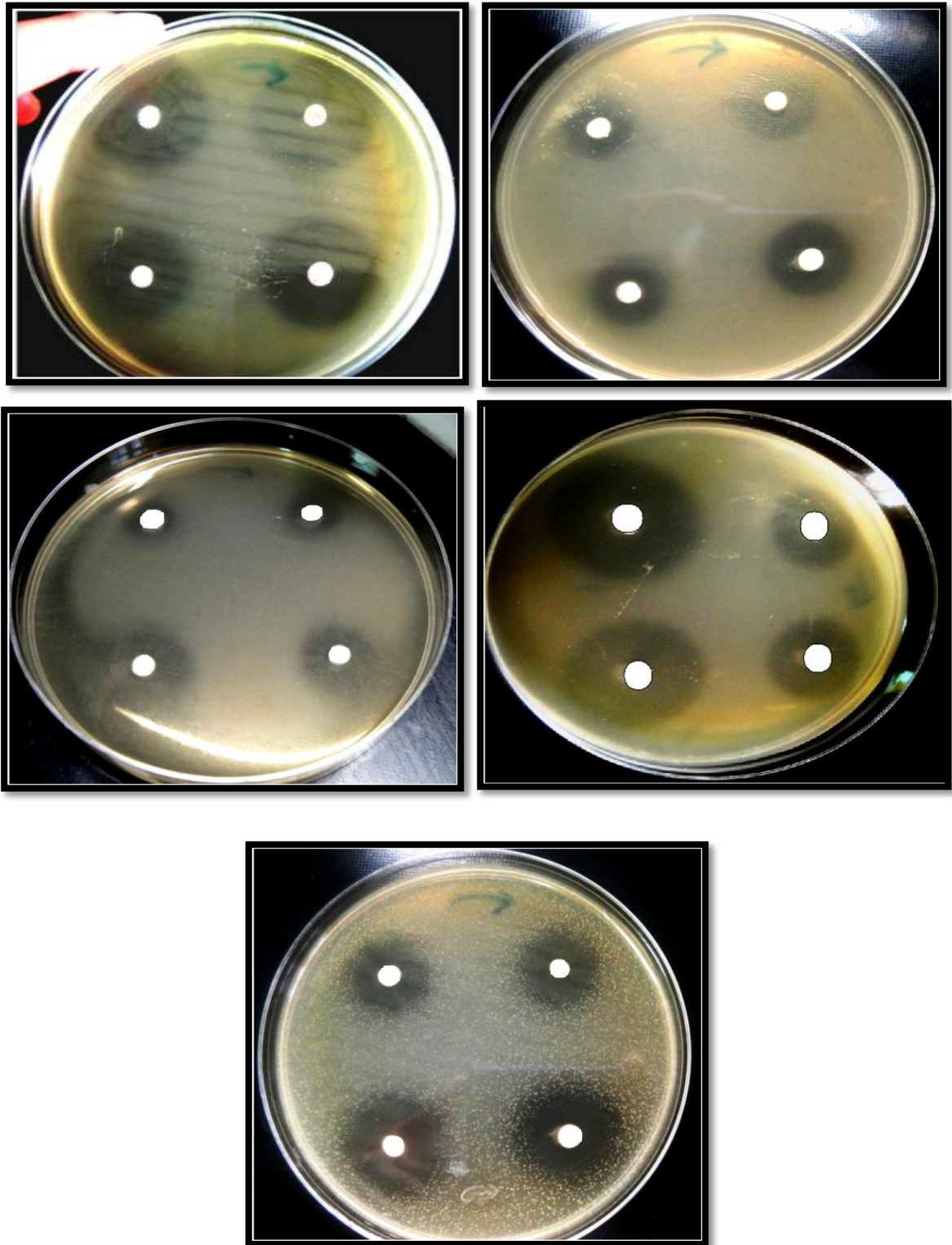


Figure 37: Quelques résultats des activités antimicrobiennes des quatre souches lactiques isolées vis-à-vis des pathogènes testés

3-Confirmation de l'antagonisme par l'étude comparative de la cinétique de croissance de *S.aureus* en culture pure et en culture mixte avec le surnageant brute de *Lb. Plantarum* isolée à partir du lait cru de chamelle :

Dans cette partie de travail, le choix s'est porté sur *S.aureus* comme souche pathogène étant la souche la plus sensible (La plus grande zone d'inhibition enregistrée était contre *S.aureus* avec Zi=16mm).

(Charlier *et al.*, 2009) ont montré que *Lactobacillus* sp et *Leuconostoc* sp présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

Les staphylocoques, en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine des infections et des pathologies qui peuvent toucher l'homme.

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés. Parmi ces infections on a les toxi-infections alimentaires, qui sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment, résistantes aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre. L'évolution est bénigne, sauf en cas de pertes hydro-électrolytiques importantes (sujets âgés, nourrissons). *Staphylococcus aureus* peut aussi causer des entérocrites aiguës, qui surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S. aureus* antibiorésistant et producteur d'entérotoxine (Avril *et al.*, 1992).

Sur la base des résultats obtenus sur l'activité antimicrobienne des souches lactiques étudiées, *Lb.plantarum* (Lb3) est considérée comme étant la souche la plus performante pour sa forte activité antagoniste vis-à-vis de *S.aureus*. Cette souche lactique a été sélectionnée comme modèle pour l'étude de l'antagonisme dans cette partie du travail.

La cinétique de croissance de *S.aureus* en culture pure (C'est-à-dire en absence de surnageant de *L.plantarum* : tube 1) et en culture mixte (en présence de surnageant de *L.plantarum* : tubes 2 et 3) dans le milieu lait écrémé est montrée dans la (figure 38).

L'estimation de la concentration bactérienne de *S.aureus* (Nombre d'UFC/mL de *S.aureus*) en culture pure (tube 1) et mixte (tubes 2 et 3) a été faite en réalisant des dénombrements bactériens sur des prélèvements périodiques effectués toutes les deux heures durant les huit heures d'incubation à 37°C, où un volume de 0,1mL de la dilution convenable (qui contient entre 30 et 300 colonies) a été ensemencé sur le milieu hyper salé de Chapman

Seulement les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies de *S.aureus* sont prises en compte (Guessas *et al.*, 2007 ; Kaban et Kaya 2006). Dans notre cas la dilution 10⁻¹ a été prise en compte puisqu'elle répond à cette condition (elle contient 260 colonies en moyenne).

$$\text{Nombre de colonies} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \text{Nombre de colonies} \times \frac{1}{V_e} \times \frac{1}{D}$$

V_e : Etant le volume d'ensemencement

D : Etant la dilution prise en compte.

Le résultat final du comptage des colonies a été converti en logarithme décimal (Log UFC/mL) en suivant les recommandations établies par Alomar (2008).

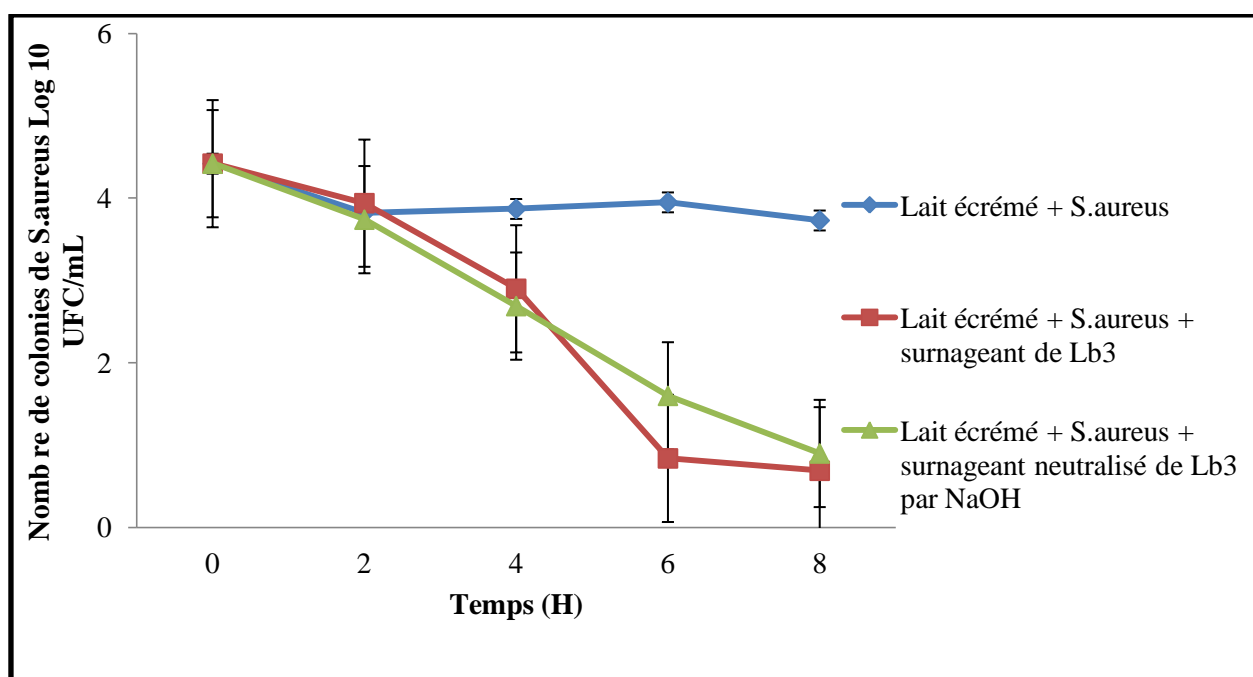


Figure 38: Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en culture pure et en culture mixte avec *Lb. Plantarum* dans le lait écrémé à 37°C.

Dans la série 1 (culture pure de *S.aureus*), le nombre de *S.aureus* a augmenté progressivement d'une manière statistiquement non significative ($p > 0.05$) puisque l'échantillon n'a pas été traité avec le surnageant de Lb3 et atteint une charge maximale après 6 heures d'incubation (la phase exponentielle), Après 6 heures d'incubation, le nombre de cellules bactériennes commence à décroître atteignant une charge de 4,73 LogUFC/mL après 8 heures d'incubation à cause de l'appauvrissement du milieu de culture en éléments nutritifs indispensables pour la croissance et la multiplication cellulaire (Phase de déclin).

La croissance de *S.aureus* a été accompagnée par un jaunissement du milieu de Chapman qui est dû à la dégradation du mannitol par les staphylocoques (**Figure 39**).

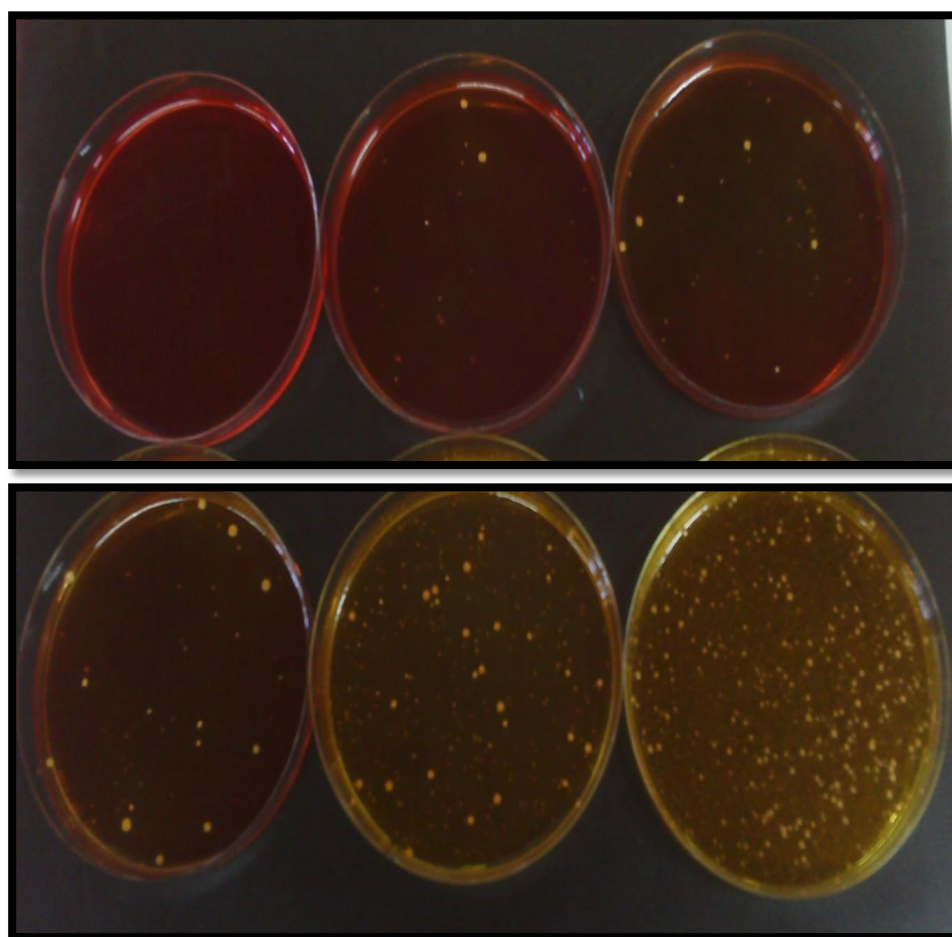


Figure 39: Evolution de la croissance de *S. aureus* en culture mixte avec *Lb. plantarum* pendant 8h d'incubation à 37°C sur le milieu hyper salé de Chapman.

Par contre en culture mixte tubes (2 et 3), *L.plantarum* a réduit considérablement la croissance de *S.aureus* dans le milieu.

On note une diminution brutale de la charge microbienne de *S.aureus* après 4 heures d'incubation seulement de 4.42 log₁₀ UFC/mL à 2.9 log₁₀ UFC/mL et 2.69 log₁₀ UFC/mL pour les tubes 2 et 3 respectivement.

La charge microbienne continue à décroître progressivement dans les tubes 2 et 3 contenant les cultures mixtes jusqu'à la disparition totale des colonies de *S.aureus* dans la dilution prise en compte (La dilution 10⁻¹ qui contenait entre 30 et 300 colonies au départ à t₀) après 8h d'incubation pour les tubes 2 et 3 respectivement. Cet événement correspond à des concentrations bactériennes inférieures à 2 log₁₀ UFC/mL (0.84 et 0.69 log₁₀ UFC/mL) et (1.6 et 0.9 log₁₀ UFC/mL) après 6h et 8h d'incubation pour les tubes 2 et 3 respectivement. C'est-à-dire des charges bactériennes inférieures à 100 colonies de *S.aureus* dans la solution mère (le lait écrémé ensemencé par les cultures mixtes).

Ces réductions de charges bactériennes enregistrées dans les tubes 2 et 3 contenant les cultures mixtes ont été statistiquement significatives (p<0.05) (test Anova : SPSS).

D'autres travaux conduits par Rodrigues *et al.* (2005) sur l'inhibition de *S. aureus* en fromagerie, ont constaté que le nombre de *S. aureus* en co-culture avec *L.plantarum* a été de 0.40 log ufc/mL après 24h comparé au témoin qui était de 5,16 log ufc/mL.

Arqués *et al.* (2005) ont remarqué une diminution dans le nombre de *S. aureus* pour atteindre 0,46 log ufc/mL comparé au témoin 6.46 log ufc/mL après 72h d'incubation. Alors qu'aucune croissance de *S.aureus* n'a été observée en culture mixte avec *L.plantarum* dans le travail de Mami *et al.*, (2008) après 72 h d'incubation.

En culture pure, le nombre de *S. aureus* n'a pas augmenté ou diminué d'une façon statistiquement significative au cours de la période d'incubation. La croissance non significative de *S. aureus* dans cet échantillon du lait peut s'expliquer par l'existence d'une activité antimicrobienne des bactéries lactiques intrinsèques de ce lait (lait écrémé d'origine bovine) contre *S. aureus*. (8 heures d'incubation est un temps très réduit pour que la flore lactique

intrinsèque puisse se multiplier et enrichir le milieu (lait) avec des quantités importantes de métabolites antimicrobiens qui inhibent rapidement la croissance de *S.aureus* dans le milieu).

En revanche, la réduction importante du nombre de cellules de *S. aureus* en culture mixte, c'est à dire en présence de surnageant brute de *L.plantarum* (dans les séries 2 et 3) après 8 heures d'incubation témoigne de l'effet antagoniste de *L.plantarum* vis-à-vis de *S. aureus* et montre aussi que l'activité inhibitrice des souches lactiques est présente dans leurs surnageants, ce qui confirme que les substances inhibitrices sont des métabolites extracellulaires.

Dans ce contexte, Laibioui *et al.*, (2005) ont trouvé que la fraction cellulaire (culot) ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes indésirables utilisées. Par contre, la fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien.

Cette activité inhibitrice de *S. aureus* par *L. Plantarum*, observée *in-vitro* nous indique sur la possibilité d'exploiter cette souche lactique pour servir comme moyen de bio-préservation des aliments et pour lutter contre les intoxications et les toxi-infections alimentaires observées dans les saisons chaudes.

4-Mise en évidence de la nature chimique des substances inhibitrices :

L'activité inhibitrice des lactobacilles peut avoir deux origines principales : La première est la production d'acide lactique; en effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques (Wilson *et al.*, 2005) ; alors que la deuxième provient de la production de substances protéiques qui sont probablement des bactériocines (Avila *et al.*, 2005 ; Mami *et al.*, 2008).

4-1-L'étude de l'effet des acides organiques « acide lactique » sur la croissance de *S.aureus*:

Afin de mettre en évidence la nature chimique des agents responsables de l'inhibition de *S. aureus* par *L. plantarum*, nous avons essayé de montrer l'effet des acides organiques élaborés par *L. plantarum* sur la cinétique de croissance de *S. aureus* dans le lait écrémé.

Pour cela nous avons éliminé l'effet inhibiteur des acides organiques (acide lactique) produits par *L.plantarum* par une neutralisation du surnageant à pH 6,5 à 7 avec le NaOH (1N).

Les résultats des dénombrements comparatifs de *S.aureus* effectués toutes les 2 heures pendant la période d'incubation pour les deux séries de flacons 2 et 3 (Avec neutralisation du surnageant de *L.plantarum* 3et sans neutralisation) sont montré dans la (**figure 40**).

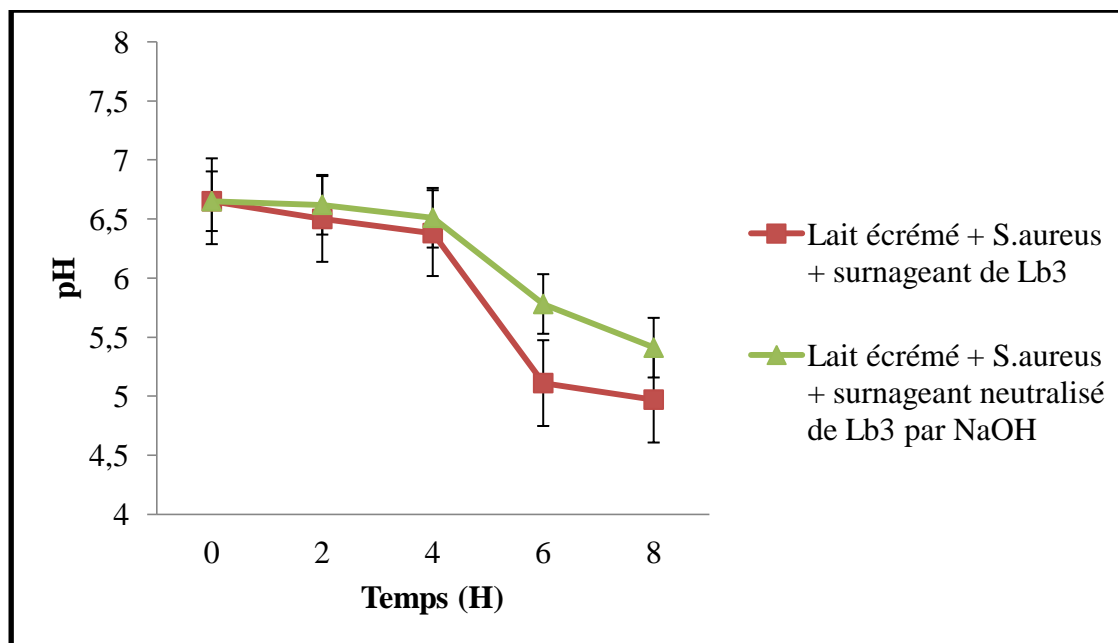


Figure 40: Evolution du pH durant l'incubation à 37°C en culture pure et en culture mixte avec et sans neutralisation du surnageant de *L.plantarum*.

Le pH est stable dans les deux séries du lait pendant les deux premières heures d'incubation, Cette phase correspond probablement à la phase de latence, nécessaire à l'adaptation des souches à leur milieu Mannu *et al.*, (2000).

Le pH diminue d'une manière statistiquement non significative ($p > 0,05$) à partir de la 4^{ème} heure d'incubation. On révèle toutefois que le pH atteint des valeurs de 4,97 et 5,41 pour les deux flacons 2 et 3 respectivement après 8 heures d'incubation.

L'étude de la cinétique de croissance de *S. aureus* dans les deux séries de flacons (2 et 3) par rapport à l'évolution de pH dans le milieu durant la période d'incubation (**Figures 38 et 40**),

montre clairement que plus le pH baisse plus la charge bactérienne de *S. aureus* diminue dans le milieu.

L'inhibition simultanée de *S. aureus* avec la diminution du pH dans le milieu signifie que l'acidité provoquée par les acides organiques produits par *L. plantarum* est un agent inhibiteur de la croissance de *S. aureus*. Cette diminution de pH a pour conséquence une inhibition significative de *S. aureus*.

McLean et McGroarty, (1996) ; Jrad *et al.*, (2013) ont montré qu'environ 60% de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques étaient éliminées lorsque les filtrats étaient neutralisés à pH 6,5 avec NaOH. Cependant, l'addition du surnageant neutralisé de *L. plantarum* à la culture de *S. aureus* a seulement réduit l'inhibition mais ne l'avait pas éliminé totalement.

L'inhibition de *S. aureus* par *L. plantarum* a eu lieu malgré l'élimination de l'effet des acides produits par la souche lactique par la neutralisation dans le flacon 3. Cela démontre que l'acidité n'est pas le seul agent responsable de l'inhibition (**Figure 38**).

Nous pouvons conclure que les acides organiques ne sont probablement pas l'unique agent responsable de l'inhibition de *S. aureus*, d'autres métabolites pourraient être impliqués.

4-2-L'inhibition par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂):

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles.

Le H₂O₂ libéré par les bactéries lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (Ouwehand et Vesterlund., (2004).

L'inhibition de *S. aureus* par la production de peroxyde d'hydrogène est exclue dans notre cas car celle-ci possède une catalase (Alomar *et al.*, 2008).

4-3-L'étude de l'effet des substances de nature protéique (bactériocines) :

Deux critères sont indispensables pour qu'une substance antibactérienne soit définie en tant que bactériocine (Klaenhammer, 1988) :

- Un mode d'action bactéricide.
- La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique.

4-3-1-Détermination du mode d'action « bactéricide ou bactériostatique »:

L'effet inhibiteur des lactobacilles peut être bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Une absence de trouble dans les contenus des trois tubes à essaiensemencés par les fragments de gélose prélevés à partir des zones d'inhibition formées entre *L.plantarum* et *S.aureus* dans les trois répétitions effectuées a été constatée (**Figure 41**).

Cela témoigne l'absence d'une fraction cellulaire survivante de *S.aureus* dans cette zone d'inhibition, donc, on conclue que *Lactobacillus plantarum* isolée à partir du lait chamelle dans cette étude possède un effet bactéricide vis-à-vis de *S.aureus*.



Figure 41: Effet bactéricide de *L.plantarum* vis-à-vis de *S.aureus*.

4-3-2-L'étude de l'action des enzymes protéolytiques et de traitement thermique sur l'apparition des zones d'inhibition contre *S. aureus* :

Comme les bactériocines sont connues par leur nature protéique, les réponses obtenues après traitement du surnageant de la culture lactique *L.plantarum* par différentes enzymes protéolytiques (pepsine et trypsine) et par la chaleur nous permettra d'identifier la nature des substances antibactériennes élaborées.

Si la zone d'inhibition disparaît en présence de l'action des enzymes protéolytiques et de la chaleur, l'agent inhibiteur est de nature protéique (Callewaert et de Vuyst, 2000 ; Aslim *et al.*, 2005). Cependant, si elle persiste après l'action de la chaleur et des deux enzymes protéolytiques utilisées, il y'a une forte probabilité pour que l'agent ne soit pas de nature protéique. (Mami *et al.*, 2008)

L'action des enzymes protéolytiques et du traitement thermique sur l'activité antimicrobienne du surnageant brute de *L. Plantarum* vis-à-vis de la croissance de *S.aureus* est montrée dans la (figure 42) et le (tableau 27).

Tableau 27: Résultats des tests d'interaction entre *S. aureus* et le surnageant de *Lb. plantarum* traité par différentes enzymes protéolytiques et par la chaleur en utilisant la méthode des puits.

	Surnageant actif de <i>L.plantarum</i>	Surnageant brute neutralisé de <i>L.plantarum</i>	Surnageant brute de <i>L.plantarum</i> traité par la pepsine	Surnageant brute de <i>L.plantarum</i> traité par la trypsine	Surnageant brute de <i>L.plantarum</i> traité par la chaleur	Bouillon MRS seul (Témoin)
Diamètre en (mm)	15±3	13±3,5	00	00	00	00

Le surnageant actif de *L.plantarum* a inhibé *S. aureus* avec une activité inhibitrice de 15± 3mm. Par contre pour le surnageant neutralisé (pH = 6,5 à 7) de *L.plantarum* l'activité inhibitrice était de 13± 3,5 mm.

Sur le plan statistique (Analyse de la variance), il n'existe pas une différence significative entre l'activité inhibitrice du surnageant actif de *L.plantarum* et celle du surnageant neutralisé.

Nous avons constaté une disparition des zones d'inhibition autour des puits qui contiennent les surnageants traités par les enzymes protéolytiques et par la chaleur (**Figure 42**).

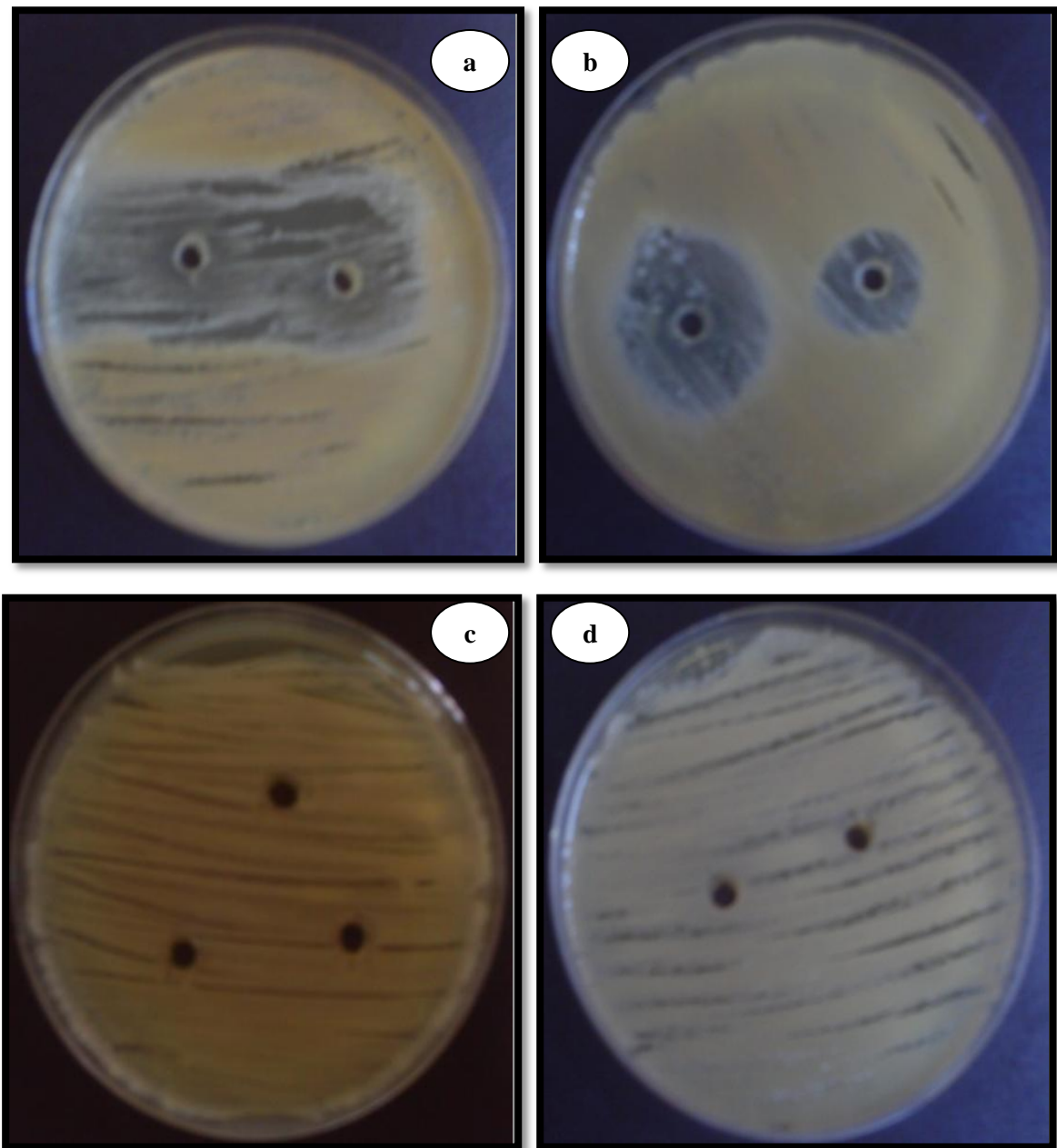


Figure 42 : Résultats des interactions entre *L. plantarum* et *S. aureus* par la méthode des puits: (a) surnageant brute de *L.plantarum*, (b) surnageant brute de *L.plantarum* neutralisé à pH=6,5, (c) traitement avec la pepsine, la trypsine et avec la chaleur. (d) Témoin (MRS liquide).

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement des surnageants avec les enzymes protéolytiques et la chaleur indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par *L.plantarum* à l'action des enzymes utilisées et celle du traitement thermique.

Ces résultats indiquent aussi que la partie biologiquement active est de nature protéique. La disparition des zones d'inhibition peut donc s'expliquer par la dénaturation structurelle et fonctionnelle de la substance protéique inhibitrice.

Ces propriétés suggèrent que cette substance inhibitrice est considérée comme substance de type « Bactériocine ». Puisque les bactériocines sont par définition des métabolites d'origine protéique, produites puis excrétées à l'extérieur des cellules productrices pour présenter une activité bactéricide (Chen *et al.*, 2003). Elles doivent être sensibles au moins à une enzyme.

En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation (Çon et Gökalp, 2000).

La production de bactériocines par *L. plantarum* est largement acceptée (Ouwehand et Vesterlund., (2004); Todorov *et al.*, (2004); Karthikeyan et Santosh., (2009) .Par conséquent, les propriétés inhibitrices de *L. Plantarum* contre *S. aureus* sont également dues à la production de bactériocines.

Récemment, un groupe de chercheurs japonais a découvert une nouvelle bactériocine, plantaricin ASM1 produite par *Lactobacillus plantarum* A-1 (Mami, 2013).

À la lumière des résultats obtenus lors de cette étude, il est permis de conclure que la propriété antibactérienne de *L. Plantarum* isolée du lait de chamelle contre *S. aureus* résulte de l'effet synergique ou l'effet combiné de plusieurs facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques, en particulier les acides organiques et des bactériocines inconnues.

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....



Conclusion

Conclusion et perspectives

La sécheresse et les conditions relativement défavorables des populations vivant dans les zones arides donnent une dimension particulière à un animal comme le dromadaire qui, en plus d'être utilisé pour le transport et les travaux des champs est surtout considéré comme un pourvoyeur de protéines nobles contenues dans ses principales productions, à savoir le lait et la viande.

Bien que pendant ces dernières années, le lait camelin a fait l'objet de multiples travaux dans le monde, très peu d'investigations ont porté sur le lait produit dans notre pays tant dans ses volets quantitatifs, liés aux conditions zootechniques de production, que dans ses volets liés à sa qualité physico-chimique et hygiénique, ainsi qu'à son apport nutritionnel.

A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une modeste contribution à une meilleure connaissance de ce lait et nous avons ciblé l'analyse physico-chimique, l'isolement de la flore lactique indigène, et enfin la valorisation de cette flore lactique par l'étude de ses propriétés technologiques et antimicrobiennes.

L'identification des souches a été réalisée par la détermination d'un certain nombre de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats obtenus ont permis d'identifier quatre souches du genre *Lactobacillus* appartenant aux espèces suivantes : *L.fermentum*, *L.helveticus*, *L.plantarum* et *L.acidophilus*.

Les résultats technologiques des souches étudiées sont satisfaisants pour une utilisation industrielle. Les souches sont thermorésistantes, elles produisent des arômes et possèdent des activités protéolytique et acidifiante presque identiques.

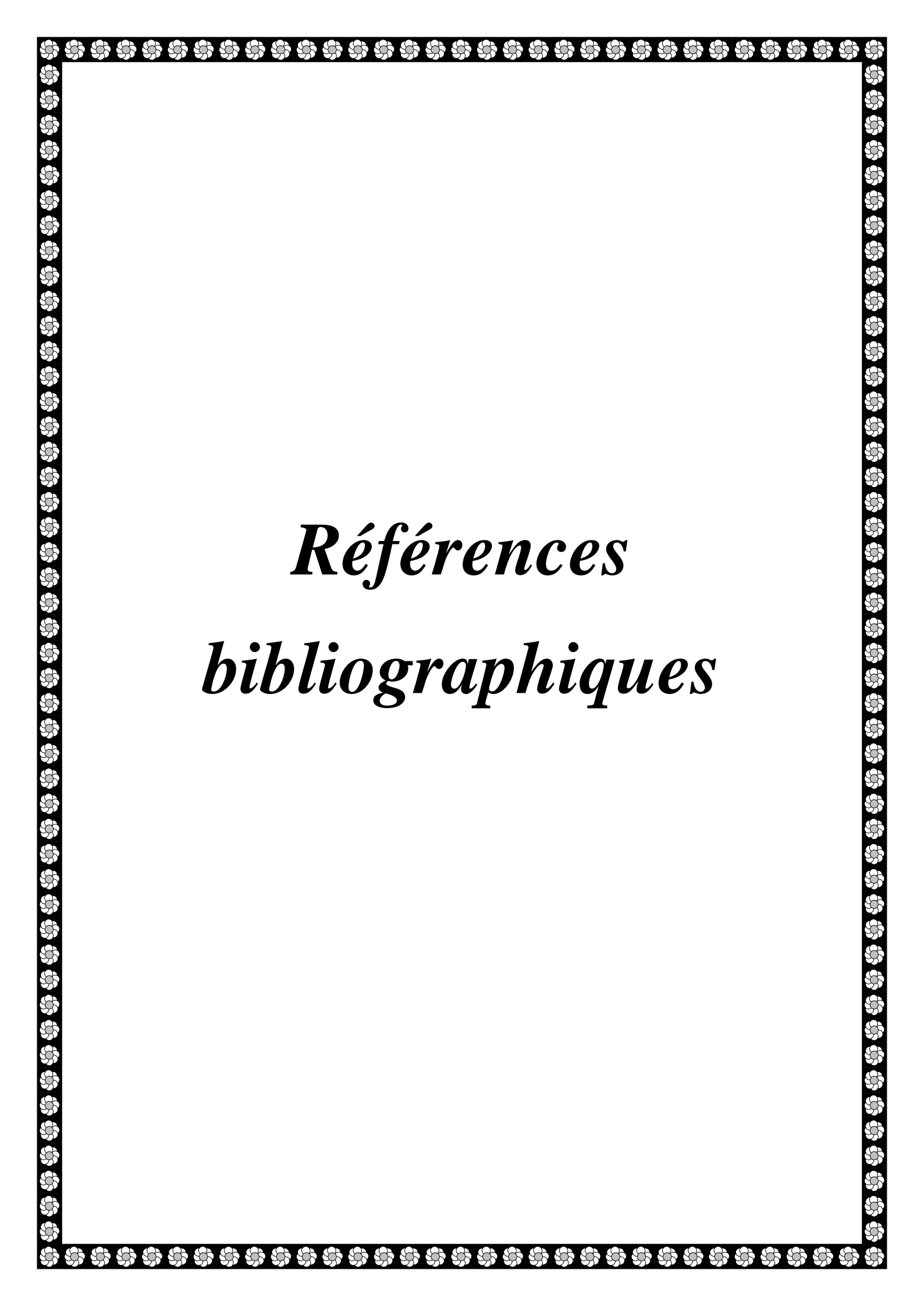
Les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle dans cette étude sont capables de produire des substances antimicrobiennes pour éliminer la croissance des bactéries pathogènes susceptibles de contaminer accidentellement le lait.

Les résultats obtenus ont montré que les propriétés antimicrobiennes de ces bactéries lactiques issues du lait de chamelle résultent de l'effet combiné de plusieurs agents biologiques provenant de leurs activités métaboliques notamment les acides organiques, et les bactériocines.

Cette propriété antagoniste indique la possibilité d'exploiter cette flore lactique comme un moyen de bio conservation des aliments pour préserver la santé du consommateur et lutter contre les empoisonnements réputés en Algérie dans la saison estivale.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail sur la flore lactique du lait de chamelle, nous proposons :

- L'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et identification de la microflore présente dans ce lait.
- Il serait intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par ces bactéries lactiques.
- Sur le plan industriel, Le développement d'un levain spécifique contenant les lactobacilles étudiés, doté d'un pouvoir bio-conservateur, permet d'augmenter la durée de conservation des produits laitiers et d'assurer une qualité sanitaire.
- Une étude supplémentaire sur le potentiel technologique des souches, surtout l'activité protéolytique
- Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

ABDEL-RAHIM A G (1987). "The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelus dromedarius*) and goat (*Capra hircus*) milk". *World Rev. Anim. Prod.*, 23: 9-11.

ABDESSEMED B., BITAM A (2013). "Antagonistic effect of the lactic bacteria isolated from the camel milk on *Staphylococcus aureus* in yoghurt manufacturing". *Journal of Pharmacy and Nutrition*.4: 46-53.

ABEE T., KLAENHAMMER T R and LETELLIER L (1994). « Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane". *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1006-13.

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 d'Ingénieur d'Etat en Agronomie Saharienne. Université d'Ouargla.

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

ABU-TARBOUSH H M., AL-DAGAL MM and AL-ROYLI M A (1998). "Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacterium in whole camel milk". *J. Dairy Sci.*, 81: 354-361.

ACCOLAS J P., BLOQUEL R and REGNIER J (1977). « Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ». *Lait.* 67: 1-23.

AGRAWAL R P., BUDANIA S., SHARMA P., GUPTA R and KOCHAR D K (2007). "Zero prevalence of diabetes in camel milk consuming Raica community of northwest Rajasthan, India". *Diabete Research and Clinical Practice.* 76, 290-296.

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

ALAOUI ISMAILI M., GUILAL J., HAMAMA A., SAIDI B ET ZAHAR M (2016). "Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc ». *Int. J. Multi-disciplinary Sci.* 1(1):81-94.

AL HAJ O A and AL KANHAL H A (2010). "Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk – review". *International Dairy Journal.* P. 1-11.

ALLOUCHE F N., HELLAL A ET LARABA A (2010). « Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière ». *Nature et Technologie.* 3: 13-20.

ALOMAR J (2008). « Etude propriétés physiologique de *lactococcus lactis* et *lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *staphylococcus aureus* en technologie fromagère-Les microorganismes pathogènes du lait et de fromage ». Thèse de Doctorat. Univ de Toulouse.

ALOMAR J., LOUBIERE P., DELBES C., NOUAILLE S AND MONTEL MC (2008). « Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk”. *Food Microbiol.* 25(3):502-508.

ALVAREZ MARTIN P., FLOREZ AB., HERNANDEZ B AND MAYO B. (2008). “Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation”. *Food Control.*19: 62-70.

AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. AND CHEVALLIER I (2006). “Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility”. *Food Control* 17: 454-468.

AN Y., ADACHI Y AND OGAWA Y (2004). “Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia”. *Anim Science Journal.* 75: 245–252.

ANANOU S., MAQUEDA M., MARTINEZ-BUENO M AND VALDIVA E (2007). “Biopreservation and ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods” in: A.Mendez-Vilas (Ed) Communication current research and educational topics and trends in applied Microbiology.

ARQUÈS JL., RODRIGUEZ E., GAYA P., MEDINA M., GUAMIS B AND NUNEZ M (2005). « Inactivation of *S. aureus* in raw milk cheese by combination of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria”. *Int. Dairy. J.* 15: 893–900.

ASHMAIG A., HASAN A AND EL GAALI E (2009). “Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camels milk (Gariss) ». *African Journal of Microbiology Research.*3: 451- 457.

ASLAM S and QAZI J I (2010). “Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants”. *Pakistan. J. Zool.* 42(5): 567-573.

ASLIM B., YUKSEKDAG Z N., SARIKAYA E AND BEYATLI Y (2005). « Determination of the bacteriocin like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products”. *LWT.* 38: 691-694.

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

AVILA M., GARDE S., MEDINA M AND NUNEZ M (2005). « Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture”. *J. Food Prot.* 68: 1026-1033.

AVRIL. J L., DABERNAT H., DENIS F AND MONTEIL H (1992). “Biopréservation by lactic acid bacteria”. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70: 331-345.

AXELSSON L (2004). “Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In* Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect”. Third Edition. Marcel Dekker.

AYAD E H E., NASHAT S., EL SADEK N., METWALY H and EL SODA M (2004). “Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria”. *Food Microbiol.* 21: 715-725.

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

BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M ET OUZROUT R (2005). « Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines "Arabia et Kabyle". *Sciences & Technologie*. 23 : 30-37.

BADIS A., GUETARNI D., MOUSSA-BOUDJEMA B., HENNI DE., TORNADIJO ME AND KIHAL M (2004). « Identification of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties". *Food Microbiol.* 3: 72-78.

BADIS A., GUETRANI D., MOUSSA BOUDJEMA B., HENNI DE AND KIHAL. M(2004). « Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races". *Food Microbiology*. 21:579-588.

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

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

BEKHOUCHE F ET BOULAHROUF A (2005). « Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine ». *Science & Technologie*. 23 : 38-45.

BEN AISSA M (1989). « Le dromadaire en Algérie ». Options Méditerranéennes – Série Séminaires 02 : 19-28.

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

BERGY'S MANUAL (2009). "Systematic of bacteriology". Second Edition. Volume three the fermicutes. Edition springer.

BHUNIA AK (2008). "Staphylococcus aureus.in « Foodborne microbial pathogens ». eds. Springer science, business media LLC. New York. P.126.

BHUNIA AK., JOHNSON M C AND RAY B (1991). " Mode of action of pédiocine AcH from *Pediococcus acidilactici* on sensitive bacterial strains". *J. Appi. Bacteriol.* 70: 25-33.

BONAÏTI C., IRLINGER F., SPINNIER H E and ENGEL E (2005). "An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model". *Journal of Dairy Science*. 88(5), 1671-84.

BOUDJANI W (2009). « Action de la flore lactique sur les bactéries contamination ». Mémoire d'ingénieur, Université de Tlemcen, Page 73.

BOUX D et LEVEAU J Y (1980). « Les levures » : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali.* 2 : 159-161.

BOUMEHIRA AZ., MAMI A., HAMED I A R., HENNI JE ET KHAL M (2011). « Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria”. *J. Pure. Appl. Microbiol.* 2: 553-566.

BOUSSOUAR I (2011). « Antagonisme entre les bactéries pathogènes et les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* –Recherche de bactériocines ». Mémoire de Master II. Université de Tlemcen.

BRIDIER A., LE COQ D., DUBOIS-BRISSONNET F., THOMAS V., AYMERICH S AND BRIANDET R (2011). The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* Biofilms Deciphered using a surface-Associated model and *In Situ* imaging. . PLoS ONE 6(1): e16177.

BUFFA M J., MORAIS A., JIMENEZ-BELENGUER E., HERNANDEZ-GIMENEZ B., GUAMI S (2005). “Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes’ milk for cheese making”. *Milchwissenschaft*, vol. 61, p.404–407.

CALLEWAERT R and DE VUYST L (2000). “Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation”. *Appl Environ Microbiol.* 66: 606–613.

CARR F J., CHILL D AND MAIDA N (2002). “The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey”. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370.

CLARK C S and MAURELLI A T (2007). « *Shigella flexneri* Inhibits Staurosporine-Induced Apoptosis in Epithelial Cells”. *Infection And Immunity.* 75 : 2531–2539.

CHAMPAGNE C P., MOINEAU S., LANGE M., GELINAS P et AUDET P (2000). « Production de ferments lactiques dans l’industrie laitière. Ed. Fondation des Gouverneurs, p 210.

CHAMPAK C., MOUSHUMI P., LIU X., VAN DER DONK W A (2005). *Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. Chemical review.* 105, 633-683.

CHARLIER C., CRETENET M., EVEN S and LE LOIR Y (2009). “Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives”. *International Journal of Food Microbiology.* 131 (1): 30-39.

CHEHMA A (2005). « Etude floristique et nutritive des parcours camelins du Sahara Septentrional Algérien: cas des régions d’Ouargla et Ghardaïa ». Thèse de Doctorat en Biologie Appliquée, Université B. Mokhtar- Annaba.

CHEN H AND HOOVER D G (2003). “Bacteriocins and their food applications”. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2 (2003) 82-100.

CHERIGUENE A., CHOUGRANI F and BENSOLTANE A (2006). “Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat’s Algerian milk”. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7) : 1242-1249.

CHETHOUNE F (2011). « Etude des caractéristiques physicochimiques, biochimiques et la qualité microbiologique du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru ». Thèse de magister en Microbiologie, Université de KASDI MERBAH OUARGLA.

CHISSOV V I et YAKUBOVSKAYA RI (1995). Cité par **KANUSPAYEVA et al., (2003).**
CHOI H J., CHEIGH C I., KIM S B ET PYUN Y R (2000). « Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi”. *Journal of Applied Microbiology* 85(88) : 563-571.

CHOLET O (2006). « Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire ». Thèse de doctorat : UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.p.16.

COGAN T.M., DOXD O., and MELLERICK D (1981). “Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1-8.

COGAN TM., BARBOSA M., BEUVIER E., BIANCHI-SALVADORI B., COCCONCELLI PS., FERNANDES I., GOMEZ J., GOMEZ R., KALANZOPOULOS G., LEDDA A., MEDINA M., REA MC AND RODRIGUEZ E (1997). «Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products”. *J. Dairy Res.* 64(3):409-421.

COLLINS M D., FARROW J A E., PHILLIPS B A., FERUSU S and JONES D (1987). “Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.

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

ÇON A H and GÖKALP H Y (2000). “Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples”. *Meat Sci.* 55(1): 89-96.

CORRERA A (2006). « Dynamique de l'utilisation des ressources fourragères par les dromadaires des pasteurs nomades du parc national du banc d'Arguin ». Thèse de doctorat en écologie et gestion de la biodiversité. Muséum national d'histoire naturelle de Paris France.

CROW V L., HOLLAND R., PRITCHARD G G and COOLBEAR T (1994). “The diversity of potential cheese ripening characteristics of LAB”. *Int. Dairy J.* 4: 723-742.

CURK M C., HUBERT J C AND BRINGEL F (1994). “*Lactobacillus paraplantarum* sp. Nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*”, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:595- 598.

DAGDEMIR E AND OZDEMIR S (2008). « Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese”. *Int J Dairy Tech.* 61: 133-140.

DALACHE F (2006). “ Effets inhibiteurs des bactéries lactiques : Bactériocines de *Lactococcus* et d’enterococcus : Mise en évidence d’un support plasmidique ».Thèse de Doctorat d’Etat. Université d’Oran.

DAVIES F L and LAW B A (1984). “Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk”. *App. Sc. Publication*. New York, USA.

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

DEEGAN L H., COTTER P D., HILL C and ROSS P (2006). “Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension”. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.

DELARRAS C (2007). « Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P : 128- 129.

DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M ET JANSSENS C (1994). « Caractéristiques générales des bactéries lactiques in « Bactéries lactiques », De Roissard et Luquet, Tech, Doc, Lavoisier, Paris ; 1 : 25-114.

DE MAN J C, ROGOSA M AND SHARPE M E (1960). “A medium for the cultivation of lactobacilli” *J. Appl. Bacteriol.* 23 : 130-135.

DE ROISSARD H ET LUQUET F M (1994). « Bactéries lactiques ». Uriage, Lorica, France, vol.1.pp.1-286.

DESAL H K., PATEL J N and PANDYA A J (1982). “Composition of camel milk”. *Gujarat Agric. Univ. Res. J.*, 2 : 131-132.

DESMAZEAUD M J et DE ROISSARD H (1994). « Métabolisme général des bactéries lactiques » ; in : « Bactéries Lactiques I », Tech. Doc., Lavoisier, Paris.

DESMAZEAUD M J ET COGAN T M (1996). « Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan T.M., Accolas J.P . Eds. Dairy Starter Cultures. *VCH Publishers, Inc.* pp. 207-231.

DE VOS P., GARRITY G M., JONES D., KRIEG N R., LUDWING W., RAINEY F A., SCHLEIFER K H AND WHITEMAN W B (2009). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.

DE VUYST L and LEROY F (2007). “Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications”. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 13: 194-199

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

DIENG M (2001). « Contribution à l’étude de la qualité microbiologique des laits caillés industrielles commercialisés sur le marché Dakarois ». *Th. Méd. Vét.*, n°10, Dakar, 111p.

DOGUIET K (2010). « Bio-contrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs caractéristique principale des bactéries lactiques ». Thèse de doctorat. Université de Bordeaux I. France.

DORTU C ET THONART P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et Intérêts pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 : 143-154.

DOUMANDJI A., HELLAL A et SAIDI N (2010). « Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11 », *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47

DRICI H (2001). « Etude biochimique de la protéolyse chez *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* et recherche du support génétique des protéases ». Mémoire de Magister : Université d'Oran-Sénia.

DRIDER D., FIMLAND G., HÉCHARD Y., MC MULLEN L M and PREVOST H (2006). “The continuing story of class IIa bacteriocin”. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 70: 564-582.

EL-AGAMY E I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C P and ASSAF R (1996). “Purification and characterization of Lactoferrin, Lactoperoxydase, Lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk”. *Int. Dairy J.*, 6: 129-145.

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

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

EL-GHAISH S., AHMADOVA A., HADJI-SFAXI I., EL-MECHERFI K E., BAZUKYAN I., CHOISSET I., RABESONA H., SITOHY M., POPOV Y G., KULIEV A A., MOZZI F., CHOBERT J M AND HAERTLÉ T (2011). “Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods”. *Trends in Food Sci. Technol.* 22: 509-516.

EL IMAM ABDALLA A (2012). “Composition and Anti-Hypoglycemic Effect of Camel Milk”. Proceedings of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research.

EL KHIDIR H E (2002). “Vitamin C status in Sudanese camels”. Ph D Thesis, University of Utrecht (The Netherlands), 98 p.

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.

EZE E N (1977). cité par **DIENG (2001).**

FAO (2016). “Camel milk”. Retrieved from. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/dairy/camel>.

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

FARAH Z (2004). “Milk”. In Z. Farah, A. Fisher (Eds), Milk and meat from the camel. Han book on products and processing. P. 25-28. Zurich. Switzer-land.Swiss Federal Institute of Technology.

FARAH Z and RÜEGG M W (1991). “The creaming properties and size distribution of Fat globules in camel milk”. *J. Dairy Sci.*, 74: 2901-2904.

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

FAYE B (1997). « Guide de l'élevage du dromadaire ». Ed SANOFI. Santé Nutrition Animale. 126 p.

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

FAYE B., KONUSPAYEVA G., MESSAD S and LOISEAU G (2008). “Discriminant milk components of Bactrian camel (*Camelusbactrianus*), dromedary (*Camelusdromedarius*) and hybrids”.*Dairy Science and Technology.* 88: 607-617.

FOSTER JW and Hall HK (1991). “Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *j. bacteriol.* 173(16):5129-5135.

FRANCOIS Z N., FLORANCE F A., PAUL M F., FELICITET M and EL SODA M (2007). « Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starters' cultures”. *Biotechnoly*, 6(1): 14-21.

FRANZ C M A P., CHO G S., HOLZAPFEL W H AND GALVEZ A (2010). “Safety of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria*”: Novel applications. pp. 341-360.

GAILLARD B., BRETON A ET BERNALIER A (1989). « Study of the nuclear cycle of four species of strictly anaerobic rumen fungi by fluorescence microscopy”. *Curr Microbiol.* 19 (2): 103-107.

GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R L AND BEN OMA N (2007). “Bacteriocin-based strategies for food bio-preservation”. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.

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

GHENNAM E H., ALLOUI-LOMBARKIA O et GHENNAM A (2007). « Evolution de quelques caractères physico-chimiques et flore microbienne du lait de dromadaire conservé aux températures ambiante et de réfrigération ». *Renc. Rech. Ruminants*, 14. P. 109.

GILLILAND S E (1985). “Concentrated starter culture”. In: *Bacterial starter cultures for foods*, Ed. Gilliland SE, CRC Press, Inc. Boca Raton USA. pp: 145-157.

GIVRY S (2006). “Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bi-fermentans* ». Thèse de Doctorat Université de Reims Champagne- Ardenne. UMR FARE – 614.

GNAN S O and SHEREHA A M (1986). “Composition of Libyan camel’s milk”. *Aust. J. Dairy Techn.* 41: 33-35.

GONG X., VISSCHER L A M., NAHIRNEY D., VEDERAS J C and DUSZYK M (2009). “The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers”. *Biochimica and Biophysica Acta.* 1788: 1797–1803.

GORBAN A M S and IZZELDIN O M (1997). “Mineral content of camel milk and colostrums”. *J. Dairy Techn.* 64: 471- 474.

GORBAN A M S and IZZELDIN O M (1999). “Study on cholesterol ester fatty acids in camel milk lipid”. *International J. Food Sci. Techn.* 34: 229-234.

GORBAN A M S and IZZELDIN O M (2001). “Fatty and Lipids of Camel Milk and Colostrum”. *International J. Food .Sci. Nutr.* 52: 283-287.

GOUBAU P ET PELLEGRIMS E(2000). Repères en microbiologie, *Édi Garant.* P: 391.

GREAUME A (1975). « Le lait cru : ce qu'il doit être, comment l'obtenir ». Th. Méd. Vét., Toulouse, n° 102, 90 p.

GUESSAS B (2007). « Potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bi control des *Staphylococcus aureus* ». Thèse de Doctorat d’Etat. Université d’Oran. Algérie.

GUESSAS B and KIHAL M (2004). « Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk”. *African Journal of Biotechnology.* 3: 339-342.

GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N and KIHAM M (2007). “Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk”. *African Crop Science Society.* 8:1159-1163.

GUINANE C M., COTTER P D., HILL C and ROSS P (2005). A review-Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.,* 98: 1316-1325.

GUIRAUD J P(1998). « Analyse du lait. Microbiologie alimentaire ». Ed DUNO.651, Paris.

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

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

HADEF S (2012). « Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales ». Thèse de Magister en Microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla.

HAMMES W P and HERTEL C (2006). “The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*”. *The Prokaryotes .* 4: 320 – 403.

HARIRI A., OUIS N., SAHNOUNI F et BOUHADI D (2009). « Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube ». *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* P : 37-55.

HASSAÏNE O (2002). « Comparaison de l'activité protéolytique chez les souches de *Lactococcus lactis* ». Thèse de Magister. Université d'Oran.

HASSAÏNE O (2013). « Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries Lactiques isolées de lait camelin du sud algérien ». Thèse de doctorat. Uni d'Oran, p. 57-102.

HASSAÏNE O., ZADI-KARAM H et KARAM N E (2007). « Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) ». *Afr. J. Biotechnol.* 6: 1720-1727.

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

HASSAN A., DESCHAMPS N et RICHARD J (1989). « Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement Microbien par formation de colonies ». Étude de référence avec *Lactococcus lactis*. Elsevier/INRA. Lait 69, 433-447.

HASSAN A., EL ZUBEIR I E M and BABIKER S A (2008). "Chemical and microbial measurements of fermented camel milk "Gariss" from transhumance and nomadic herds in Sudan". *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 2: 800-804.

HEQUET A., LAFFITE V., SIMON L., DE SOUSA-CAETANO D., THOMAS C., FERMAUX C and BERJEAUD J M (2007). « Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat". *Int. J. Food Microbial.* 113: 67-74.

IDOUI T (2008). « Les bactéries lactiques indigènes: Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar ». Thèse de Doctorat d'Etat : Université d'Oran : Algérie, p.179.

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

IDOUI T., BOUDJERDA J., LEGHOUCHE E and KARAM N E (2009). "Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits". *Gr. Y. Aceites.* 60 (2): 177-183.

ISAAC B L (2009). « Analyse bactériologie des saucissons vendus dans les alimentations de la ville de Kisangani dans la commune Makiso ». [http : //memoireonline.com/12/10/4163/Analyse-bactériologique-d](http://memoireonline.com/12/10/4163/Analyse-bactériologique-d).

JOFFIN J N et LEYRAL G (1996). « Microbiologie technique ». Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223.

JOSEPH –PIERRE G (2003). « Microorganisme intervenant dans l'industrie alimentaire », In : Microbiologie alimentaires, application à l'étude des principaux groupes microbiens. 1 Eds 91-294.

JOUAN P (2002). « Lactoprotéines et lactopeptides. Propriétés biologiques ». INRA publ., Versailles, 127 p.

JRAD Z., EL HATMI H., FGURI I., ARROUM S., ASSADI M and KHORCHANI T (2013). “Antibacterial activity of Lactic acid bacteria isolated from Tunisian camel milk”. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(12): 1002-1008.

KABAN G, KAYA M (2006). “Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk”. *Food Control.* 17:797-801.

KAMOUN M. (1994). « Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : Conséquences technologiques ». Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie.

KAMOUN M. (1995). « Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation ». *Option Médit.* 13 : 81-103.

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

KANDLER O., WEISS N (1986). “Regular, non-sporing gram-positive rods” In Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins (Eds), Baltimore, 2: 1208-1234.

KANUSPAYEVA G., FAYE B et SERIKBAEVA A (2003). « Les produits laitiers traditionnels à base de lait de chamelle en Asie centrale ». Workshop on camel milk in Africa. FAO-CIRAD-KARKARA, Niamey (Niger), 5-8/11/03.

KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998). Sequence Analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *J. Dairy Res.*, 65, 206-222.

KARAM N (1995). « Constitution d’un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique ». Thèse de doctorat d’Etat, Université d’Oran.

KARTHIKEYAN V et SANTOSH S W (2009). “Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*”. *African Journal of Microbiology Research.* 3(5):233-239.

KARSKA-WYSOCKI B., BAZO M and SMORAGIEWICZ (2010). “Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research,* 165(8): 674-686.

KASET (1987) in KLAENHAMMER T.R., FERMAUX C. et HECHARD Y (1994). “Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques; in « Bactéries lactiques I ». De Roissard et Luquet, Tech. Doc., Lavoisier, Paris.

KHAN B and IQBAL A (2001). « Production and composition of camel milk”. *Pakistanian Journal of Agriculture Science*, 38, p. 3-4.

KHANDELWAL D., JOSHI H AND CHAUDHARY BL (2015). “Antagonistic effect of Lactobacilli of Camel Milk against *Aeromonas veronii* isolated from Pichola lake, Udaipur, Rajasthan, India”. *Res. J. Rec. Sci.* 4:170-172.

KHASKHELI M., ARAIN M A., CHAUDHRY S., SOOMRO A H and QURESHI T A (2005). “Physico-Chemical Quality of Camel Milk”. *Journal of Agriculture and Social Sciences*. 1(2): 164–166

KHEDID K., FAID M., MOKHTARI A., SOULAYMANI A and ZINEDINE A (2009). “Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco”. *Microbiological Research.*, 164: 81-91.

KHEROUATOU N., NASRI M and ATTIA H. (2003). “A study of the dromadary milk casein micelle and its changes during acidification”. *Brazilian J. Food Techn.*, 2: 304-318.

KHEROUATOU N., DHOUIB A and ATTIA H (2003). “Behavior of dromadary Milk at native and acid pH during ultrafiltration, Comparison with cow milk” *.Sci. Alim.* 23: 237-244.

KHUNTIA A AND CHAUDHARY LC (2002). “Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of *lactic acid bacteria* to diet. *Asian-Australasian*” *.Journal of Animal Sciences* 15: 188-194.

KIHAL M (1996). « Etude de la production de dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d’application en technologie fromagère type fromage bleu ». Thèse de Doctorat d’Etat. Université d’Oran Algérie.

KIHAL M., CHEKROUN A., BENSOLTANE A., KHEROUA O AND SAIDI D (1999). « Characterization of Algeria raw camel’s milk: proteins content and native lactic acid bacteria ». 1ères Journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla.

KLAENHAMMER T R (1988). “Bacteriocins of lactic acid bacteria”. *Biochim.*,70: 337-349.

KLAENHAMMER TR (1993). “Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria”. *Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.

KLAENHAMMER T R., FREMAUX C et HECHARD Y (1994). « Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques ». In. De Roissard and Luquet (Eds), *Bactéries Lactiques I. Tech. Doc*, Lavoisier, Paris. Pp. 353- 365.

KÖNIG H AND FRÖHLICH J (2009). “Lactic Acid Bacteria” **In** *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H. *et al.* (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 3-29.

LAIBIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M ET OUHSSINE M (2005). « Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes ». *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, 144: 237-250.

LAIRINI S, BEQQALI N, BOUSLAMTI R, BELKHOUE R, ZERROUQ F (2014). « Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir ». *Afr. Sci.* 10(4) : 267-277.

LAHELEC C ET COLIN P (1991). « Méthode d'évaluation des différentes microflores à incidence technologique: la flore psychrotrophe. In : techniques d'analyses et contrôle dans les IAA », Tec. & Doc., Vol.3, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

LAMONTAGNE M., CHAMPAGNE C P, REITZ A J., MOINEAU S., GARDNER N., LAMOUREUX M., JEAN J ET FLISS I (2002). « Microbiologie du lait », In : Science et Technologie du Lait : Transformation du lait. Vignola C.L. *Ecole Polytechnique Montreal.* pp: 75-128.

LAMONTAGNE M., CHAMPAGNE C P ET GARDNER N (2010). « Microbiologie du lait ». Dans : VIGNOLA C.L. Science et technologie du lait. Fondation de technologie laitière. Québec : Presses internationales polytechniques, p.75-153.

LARPENT J P (1997). « Analyse des croûtes de fromage » ; in : « Microbiologie Alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris. 10-72.

LARPENT J P., COPIN M P., GERMONVILLE A., JACQUET M et THETAS JL (1997). « Microbiologie du lait et des produits laitiers » ; in : « Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.

LARSSON-RAZNIKIEWICZ M and MOHAMED M A (1994). "Camel's (*Camelus dromedarius*) Milk: properties important for processing procedures and nutritional value". Actes du Colloque : « Dromadaires et chameaux animaux laitiers », 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

LAW J and KOLSTAD A (1988). « Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening ». *Appl. Sci.* 1: 365-365.

LEE Y K and SALMINEN S (2009). "Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd Ed. A John Wiley and Sons, Inc, Publication".

LEROY F and DE VUYST L (2004). "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry". *Tre. Food Sci. Technol.* 15: 67-78.

LEROY F et DE VUYST L (2007). « Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications ». *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194-199.

LEVEAU JY., BOUIX M et DE ROISSART H (1991). « La flore lactique » In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-186.

LEVEAU J Y et BOUIX M (1993). « Les levures ». Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.

LEYRAL G et VIERLING E (2007). « Microbiologie et toxicologie des aliments » .3^{ème} édition Doin. France. P. 87-114.

LILLY D M et STILLWELL RH (1965). “Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms”. *Science*.147: 747-748.

LIN T Y et CHIEN MFC (2007). « Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time “. *Food .Chem.* 100: 1419-1423.

LISTER J (1873). “A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes”. *Quart. J. Microbiol. Sci.* 13: 380-408.

LISTER P D., WOLTER D J and HANSON N D (2009). “Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms”. *Clinical Microbiology Reviews.* 22 : 582–610.

LOISEAU G., FAYE B., SERIKBAEV A A and MONTET D (2001). « Enzymes ability to serve as markers of pasteurized camel milk”. *Int. Conf. On new horizons in biotechnology*, 18-21 avril 2001, Trivandrum, Inde.

LONGO H F., CHEHMA A et OULAD BELKHIR A (1988). “Quelques aspects botaniques et nutritionnels des pâturages du dromadaire en Algérie ». *Option méditerranéennes série séminaires*, n° 2, 1989. pp. 47-53.

LUQUET F M (1985). « Lait et Produits Laitiers ; Vache, Brebis, Chèvre ». *Tec. Doc.*, ^{2ème} Ed., Lavoisier, Paris.

LUQUET F M et CORRIEU G (2005). « Bactéries lactiques et probiotiques ». *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.

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. Université Kasdi Merbah d’Ouargla.

MAGUENNI N., HOUALI K., IRATI G et MATI-MOULTI F (2011). « Etude de l’antagonisme des souches de bactéries lactiques du lait cru de chamelle et du lait cru de brebis vis-à-vis des bactéries pathogènes ». 5eme colloque international francophone de microbiologie animale ; Marrakech du 3 au 5 avril 2011.

MAKHLOUFI K M (2012). « Caractérisation d’une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza ». Thèse de doctorat de l’université pierre et marie curie. Paris, France.

MAILLOT M (1985). « Les toxi-infections alimentaires par les produits laitiers ». *Th. Méd. Vét.*, Toulouse, n° 85, 99 p.

MAL G and PATHAK K M L (2010). “Camel milk and milk products”. In: *Milk and milk products. “SMVS Dairy Year Book”* p. 97-103.

MAMI A (2013). « Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d’action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie ».Thèse de doctorat. Université d’Oran.

MAMI A., HENNI J E AND KIHAL M (2008). “Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat’s Milk against *Staphylococcus aureus*”. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 3 (2): 39-49.

MAMI A., HAMED I A., HENNI J., KERFOUF A ET KIHAL M (2010). “Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolé du lait cru de chèvre d’Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ». *Les techniques de laboratoire*, volume 5, N°21.

MANNU L., COMUNIAN R and SCINTU M F (2000). « Mesophilic lactobacilli in flore Sardo cheese : PCR- identification and evolution during cheese ripening”. *International Dairy Journal*. 10 : 383-389.

MARRUG J D., MEIJER W., VAN KRANENBURG R., LAVERMAN P., BRUINENBERG P.G and DE VOS W M (1995). « Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis* : control of transcription initiation by specific dipeptides”. *J. Bacteriol.* 177, 2982-2989.

MARTH E H et STEELE J L (2001). “Applied Dairy Microbiology”. Marcel dekker, inc. New york.

MATHARA J M., SCHILLINGER U., KUTIMA P M., MBUGUA S K and HOLZAPFEL W H (2004). “Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of *kule naoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya”. *Int. J. Food Microbiol.* 94 (3): 269-278.

MATHIEU J (1998). « Initiation à la Physico-chimie du Lait ». Tec. Doc. Ed 1., Lavoisier.

MCFARLAND J (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 49(14):1176-1178.

MC LEAN N W and MC GROARTY JA (1996).”Growth inhibition of metronidazole susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli *in vitro*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 1089- 1092.

MEDJOUR A (2014). « Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d’élevage (extensif et semi-intensif) ». Mémoire de Magister. Université De Biskra.

MEHAIA M A (1992). « Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin”. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 20: 31-40.

MEHAIA M A (1993a). “Fresh soft white cheese (Domiaty type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation”. *J. Dairy Sci.*, 6: 2845-2855.

MEHAIA M A (1994b). “Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat Treatments”. *Food Chem.*, 50: 153-155.

MEHAIA M A and Al-KAHNAL M A (1989). “Studies on camel and goat milk proteins: nitrogen distribution and amino acid composition”. *Nutrition reports international*, 39: 351-356.

MEHAIA M A., HABLAS M A., ABDEL-RAHMAN K M and EL-MOUGY S A (1995). Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chem.*, 52, 115-122.

MEIJER W C., MARRUG J D and HUGENHOLTZ J (1996). “Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*”. *Appl Environ Microbiol.* 62, 156-161.

METLEF S et DILMI-BOURAS A (2009). « Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente ». *Rev. Nat. Tec.* 1 : 33-44.

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

MKRTCHYAN H., GIBBONS S., HEIDELBERGER S., ZLOH M AND LIMAKI H K (2010). “Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* 317/402 strain narine”. *Int. J. Antimicrobial Agents.*, 35: 255-260.

MOËLLER V (1955). “Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system”. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172.

MONNET V., LATRILLE E., BÉAL C et CORRIEU G (2008). « Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques ». In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 512-592.

MONSALLIER G (1994). Cité par **DIENG (2001).**

MORRISON W R (1968). « Fatty acid composition of phospholipids”. *Lipids.*, 3: 107-110.

MOUCHET F (1962). « Essai sur le dénombrement des bactéries endogènes et coliformes dans le lait pasteurisé conditionné ». Th. Méd. Vét., Lyon, n° 40, 75 p.

MOZZI F., RAYA R R and VIGNOLO G M (2010). “Biotechnology of lactic acid bacteria”, Novel applications. *Blackwell. Publishing.* 13.

NAGHMOUCHI K., BELGUESMIA Y., BAAH J., TEATHER J AND DRIDER J (2010). “Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with Polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*”. *Research in Microbiology*, 162: 99-107.

NAUCIEL C ET VILDE J L (2005). « Bactériologie médicale: Abrégés Connaissances et pratique ». *Elsevier Masson.* Paris. pp : 257.

NDIAYE A(1994). Cité par **DIENG (2001).**

NIGATU JM., TUJI FA ET TEFERA A T (2015). « Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk *ergo*, against some food-borne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese *ayib* ». *Afr. J. Microbol. Res.* 9(29):1789-1797.

NIGUTOVA K., MOROVSKY M., PRISTAS P., TEATHER R M., HOLO H and JAVORSKY P (2007). “Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of en IA homologues among ruminal Gram-positive cocci”. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2): 563-569

NOVEL G (1993). « Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel ». Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

ORLA-JENSEN S (1919). The Lactic Acid Bacteria; Host and Son: Copenhagen.

OUWEHAND A C and VESTERLUND S (2004). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria in Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. New York : Marcel Dekker, p. 375–395.

OULD AHMED M (2009). “Caractérisation de la population des dromadaires (*Camelusdromedarius*) en Tunisie ». Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de Tunisie.

PARADA L J., CARON C R., BIANCHI A., MEDEIROS P and SOCCO C R (2007). “Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives”. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 50(3): 521- 542.

PENNER R., FEDORAK RN and MADSEN KL (2005). “Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases”. *Current Opinion in Pharmacology.* 5(6):596-603.

PILET C., BORDON J L., TOMA B., MARCHAL M and BALBASTRE C (1979). Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne, 2ème Ed., DOIN, Paris.

PILET M F., MAGRAS C ET FEDERIGHI M (1998). Bactéries lactiques. PP 235- 260. In Manuel de Bactériologie Alimentaire.

POUMEYROL M ET LAFARGE V (1997). « Staphylococcus à coagulas positive in « Microbiologie alimentaire » : Technique de laboratoire »Ed. Tec et Doc., Lavoisier, Paris.1073p.

PRAJAPATI J P., PINTO S V., WADHWANI K N and PATEL A B (2012). “Utilization of Kachchhi Camel Milk for Manufacturing of Medium Fat Ice Cream”. In Proceedings of the 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Development.P. 416418. Muscat, Sultanate of Oman.

PRAT M L (1993). « L'alimentation du dromadaire ». Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

PRESCOTT L M., HARLEY J P., KLEIN D A., BACQ-CALBERG C M et DUSART J (2003). Microbiologie. Deboeck.

PRESCOTT L M., HARLEY J P et KLEIN D A (2010). Microbiologie Ed Deboeck.

PRIOULT G (2003). « Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action ». Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec.

RAHLI F (2015). « Valorisation du lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement ». Thèse de doctorat. Univ d'Oran.

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.

RAMPAL M., OUWEHAND A C and VESTERLUND S(2000). "Antimicrobial components from lactic acid bacteria ». *Appl Environ Microbiol.* 57(1):114-121.

RAYNAUD S., PERRIN R., COCAIGN-BOUSQUET M and LOUBIERE P (2005). « Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to auto acidification and temperature downshift in skim milk". *Applied And Environmental Microbiology*, 71(12) : 8016-8023.

REID G and BURTON J (2002). "Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic Bacteria". *Microbes and Infections* 4, 319-324.

RICHARD C (1996). "Evidence on correlation between number of Disulfide Bridge and Toxicity of class IIa bacteriocins". *Food. Microbiol.*, 23(2) : 175-183.

ROCHELLE M., CLAVERO S and BEUCHAT L R (1996). « Survival of *Escherichia coli* O157:H7 broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery". *Appl. Envir.Microb.* 62: 2735- 2740.

RODRIGUEZ E., CALZADA J., ARQUES J L., RODRIGUES J M., NUNEZ M ET MEDINA M (2005). "Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese". *Int. Dairy J.* 15: 51-57.

SAAD N (2010). « Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche *in vitro* », thèse de doctorat. Ecole doctorale Biologie - Santé. Université de Limoges.

SACK B R., MAHBUBUR R, YUNUS M AND ERADUL H K (1997)."Antimicrobial Resistance in Organisms Causing Diarrheal Disease". *Clinical Infect Diseases.* 24 :102-105.

SAIDI N., GUESSAS B., BENSALAH F., BADIS A., HADADJI M., HENNI DE., PREVOST H ET KIHAL M (2002). « Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides ». *J. Alg. Reg. Arides* 1: 1-11.

SALAWU M B., WARREN E H and ADESOGAN A T (2001). “Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminant degradation of ensiled pearl wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or *quebracho tannins*”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1263-1268.

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

SALMINEN S., WRIGHT A ET OUWERHAND A (2004). “Lactic acid bacteria”, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. Marcel Dekker.

SAMMAN M A., AI-SALEH A A and SHETH K (1993). “The Karyotype of the Arabian Camel, *Camelus dromedaries*”. *J. King. Saud. Univ. Science* 1: 57-64.

SANDHOLM M., MÄTTÖ J., SAARELA M (1999). “Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora”. *Int. Dairy.J.* 9: 25–35.

SATURA (1998). « Essai d’optimisation de la production d’acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus* ». Mémoire de magister. Univ M’Hmed Bougara –Boumerdés.

SAWAYA W N., KALIL J K., AL-SHALHAT A and AL-MOHAMED H (1984). “Chemical composition and nutritional quality of camel milk”. *J. Food Sci.*, 49 : 744–747.

SBOUI A., KHORCHANI T., DJEGHAM M., AGREBI M., ELHATMI H., BELHADJ O (2009). “Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l’acidité à différentes températures ». *Afrique Science* 05(2) : 293 – 304.

SEMASAKA G (1986). « Contribution à l’étude de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar ». Th. Méd. Vét., Dakar, n° 6, 133 p.

SHAHANI K M., FERNANDES C F and AMER M A (1987). « Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products”. *Microb Lett* .46:343-356.

SIBOUKEUR O., MATI A et HESSAS B (2005). « Amélioration de l’aptitude à la coagulation du lait cameline (*Camelus dromedarius*) : Utilisation d’extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires ». *Cahiers Agricultures*.14 (5) :473- 478.

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 ELHarrach-Alger.

SIEUWERTS S., DE BOK F A M and HUGENHOLTZ J (2008). “Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches”. *Applied And Environmental Microbiology*. 74: 4997–5007.

SKIDMORE J A (2005). « Reproduction in dromedary camels: an update. *Anim. Reprod.*,2, N°3, p.161-171.

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. p 74.

SMITH L and PALUMBO M (1983). De Bacterias Lacticas: Novel approaches for the development of lactic acid bacteria resistant to phages. Aniverario. *Technologia Lactea Latinoamericana*.7.

SNEATH S (1973). “Numerical Taxonomy Freeman and Company” San Francisco. 230-234.

SNEATH P H A., MAIR N S., SHARPE M E and HOLT J G (1986). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

SOUILEM O and BARHOUMI K (2009). « Physiological Particularities of Dromedary (*Camelus dromedarius*) and Experimental Implications”. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 36 : 19-29.

STILES M E and HOLZAPFEL W H (1997). “Lactic acid bacteria of food and their current Taxonomy”. *International Journal of Food Microbiology.* 36: 1-29.

TABAK S (2007). « Interactions entre *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales et Bifidobacteries ». Mémoire de Magister, Université d’oran.

TADESSE G., EPHRAIM E and ASHENAFI M (2004). « Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity”. *Food Safety,* 5: 13-20.

TADESSE G, EPHRAIM E, ASHENAFI M (2005). « Assessment of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and affect of growth medium in the inhibitory activity”. *Internet J. Food Saf.* 5:13-20.

THAPA N., PAL J and TAMANG J P (2006). “Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fish products of the eastern Himalayas”. *International J Food Microbiol,* 107(1): 8-33.

THOMPSON J., GENRY-WEEKS C R (1994). “Métabolisme des sucres par les bactéries Lactiques ». Dans : DE ROISSARD ET LUQUET, *Bacterie lactique,* Paris : Tec & Doc., Lavoisier.

TITIEK F D., ENDANG S R., DJOKO W and SLAMET S (1996). “Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isoleted from *Gro wol*”. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* 3(2): 29-34.

TODOROV S D., VAN REENEN C A and DICKS L M (2004). “Optimization of bacteriocin production by *Lctobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barely beer”. *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 50: 149-157.

TOPISIROVIC L., MILAN K., DJORDJE F., NATASA G., IVANA S and JELENA L (2006). “Potential of lactic acid bacteria isolated from specific naturel niched in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 230-235.

TRIAS R., BAÑERAS L., BADOSA E and MONTESINOS E (2008). « Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against food-borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria”. *Journal of Food Microbiology* 123: 50–60.

TWOMEY D., RYAN M., MEANEY B and HILL C (2002). “Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications”. *Antonie van Leeuwenh.* 82: 165-185.

UEHARA S., MONDEN K., NOMOTO K., SENO Y., KARIYAMA R AND KUMON H (2006). “A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection”. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.

VALLE J, GOMEZ-LUCIA E, PIRIZ S, GOYACHEJ , ORDEN J A AND VADILLO S (1990). “Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats”. *Applied and Environmental Microbiology.* 56:1323-1326.

VERNOZY- ROZAND C (1997). « Méthode d’identification des Staphylococcus ». In « Microbiologie Alimentaire » : Techniques de laboratoire. LARPENT J.P.ed .Tec et Doc., Lavoisier.Paris. p 1073.

WANGO J., FARAH Z and PUHAN Z. (1998a). “Iso-electric focusing of camel milk proteins”. *Int. Dairy J.*, 8: 617-621.

WARDANI AK., EGAWA S., NAGAHISA K., SHIMIZU H AND 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: 220-230.

WARDEH M F and DAWA M (1995). “Camels and dromedaries”: Generals Perspectives. ICAR Technical Series n°11. p. 1-9.

WILSON AR., SIGEE D and EPTON HA (2005). “Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production”. *J. Appl. Microbiol.* 99(6) :15-22.

XANTHOPOULOS V., LITOPOULOU-TZANETAKI E and TZANETAKIS N (1997). “*In vitro* study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal” .In “Lactic Acid Bacteria – Lactic”. Presses Universitaires de Caen. France.

XIA L., YOON-KYUNG C., SHANG-TIAN Y and AHMED E Y (2005). “Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*” .*Process Biochemistry* 40: 13–24.

XIE Y., AN H., HAO Y., QIN Q., HUANG Y., LUO Y and ZHANG L (2011). “Characterization of an anti- *Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-

B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China". *Food Control*. 22: 1027-1031.

YAGIL R (1982). "Camels and Camel Milk". FAO, Animal Production and Health, Paper N° 26, 1- 69.

YAGIL R and ETZION Z (1980). "Effect of drought conditions on the quality of camel milk". *J. Dairy. Res.*, 47: 159-166.

YATEEM A., BALBA M T., AL-SURRAYAI T., AL-MUTAIRI B and AL-DAHER R (2008). "Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk". *Int. J. Dairy Sci.*3: 194-199.

YVON M (2006). "Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria Australian". *Journal of Dairy Technology*. 61(2): 89-96.

ZADI -KARAM H (1998). « Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages ». Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Constantine, Algérie.

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

ZIA-UR-RAHMAN and SRATEN M V (1994). "Milk Production and composition in lactating camels injected with recombinating bovin somatotropin". Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers" 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

ZOURARI A., ACCOLAS J P and DESMAZEAUD M J (1992). «Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria". *A review. Lait*. 72: 1-34.



Les annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Peptone.....	10 g/L
Extrait de viande.....	10 g/L
Extrait de levure05 g/L
Glucose20 g/L
Phosphate bipotassique02 g/L
Acétate de sodium05 g/L
Citrate d'ammonium.....	.02 g/L
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O0.2 g/L
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O.....	.0.5 g/L
Agar	15 g/L
Eau distillée qsp	1000mL

pH= 6.2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980) :

Extrait de levure.....	.03 g/L
Peptone.....	2.5 g/L
Glucose.....	.05 g/L
Agar.....	15 g/L
Eau distillée	1000ml.

pH 6.6.

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu Chapman :

Peptone	10g/L
Extrait de viande01g/L
Chlorure de sodium75g/L
Mannitol	10g/L

Rouge de phénol0.025g/L
Agar15g/L
Eau distillée1000mL
pH 7.4
Autoclave 120° C, 20min

Lait écrémé :

Lait écrémé100 g/L
Extrait de levure3 g/L
Eau distillée1000 mL
pH= 6.6
Autoclavage 110°C, 10 minutes.

Milieu TSA (Tryptic Soja Agar) :

Peptone de caséine17 g/L
Peptone de farine de Soja3g/L
Glucose5g/L
Chlorure de sodium..... 5g/L
Phosphate di potassique2,5g/L
Eau distillée..... 1000 mL
pH : 7,3
Autoclavage 120°C, 20 min

Annexe II : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame stérile, déposer une goutte d'eau physiologique.
- Prélever une colonie bien isolée et mélanger avec la goutte d'eau.
- fixer à la chaleur le frottis préparé.
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du Lugol pendant 30 secondes ;

- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100). Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe III : Cinétique de croissance et d'acidification du milieu lait écrémé par les quatre souches lactiques durant 48hd'incubation à 30°C:

Souche lactique	Paramètres mesurés	Temps d'incubation (H)						
		0	2	4	6	8	24	48
Lb 1	pH	6.62	6.52	6.50	6.44	5.92	5.41	5.35
	Acidité °D	19	20	21	22	31	42	64
	[UFC/mL]	7.94	8.27	8.62	8.84	9.47	9.68	9.71
Lb 2	pH	6.62	6.56	6.48	6.40	5.79	5.45	5.28
	Acidité °D	19	20.5	23	24	33	40	56
	[UFC/mL]	7.96	8.04	8.27	8.73	8.91	9.02	9.21
Lb 3	pH	6.62	6.54	6.46	6.36	5.74	4.92	4.70
	Acidité °D	19	20	23.5	25	34	50	75
	[UFC/mL]	7.67	7.98	8.08	8.60	9.29	9.55	9.67
Lb 4	pH	6.62	6.50	6.43	6.28	5.72	4.80	4.64
	Acidité °D	19	22	24	28	35	52	82
	[UFC/mL]	7.63	7.95	8.46	8.84	8.92	9.39	9.85

Annexe IV: Profils fermentaires des quatre souches lactiques obtenus sur les galeries API50CH et leur identification par la base de données « Apiweb ».

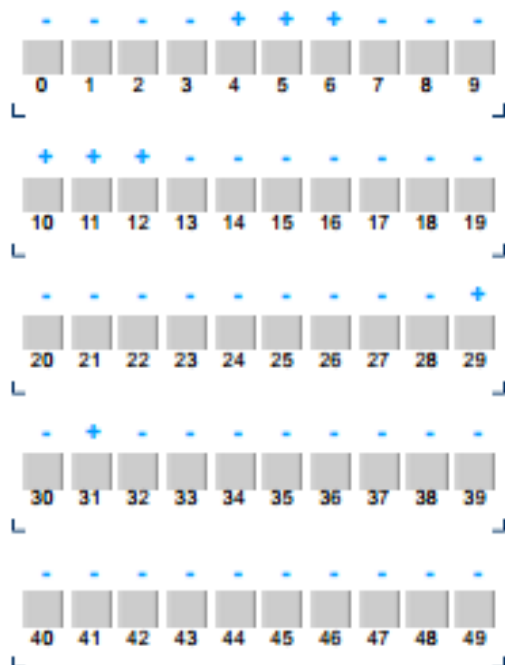
Lb1 :

02/05/2017

apiweb™ - Résultat d'identification



API 50 CHL V5.1



REFERENCE

BENTOURA Amira

DATE

15/01/16

COMMENTAIRE

Identification de la souche Lb1 par la galerie API50CHL

BONNE IDENTIFICATION

Galerie

API 50 CHL V5.1

Profil

.....+++++.....+.....

Note(s)

Taxons significatif(s)

Lactobacillus fermentum 1

% ID

94.9

T

0.66

Test(s) à l'encontre

MAL 95% MEL 90% RAF 76%

Taxon suivant

Lactobacillus brevis 3

% ID

2.3

T

0.48

Test(s) à l'encontre

MAL 98% LAC 13% MEL 76% SAC 7%
GNT 87%

[Fermer](#)

[Imprimer](#)

Lb2 :

02/05/2017

apiweb™ - Résultat d'identification



API 50 CHL V5.1



REFERENCE

BENTOURA Amira

DATE

15/01/16

COMMENTAIRE

Identification de la souche Lb2 par la galerie API50CHL.

BONNE IDENTIFICATION AU GENRE

Galerie

API 50 CHL V5.1

Profil

.....++++.....

Note(s)

Taxons significatif(s)

Lactobacillus helveticus

% ID

71.3

T

0.93

Test(s) à l'encontre

Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1

26.5

0.92

SAC 81%

Taxon suivant

Leuconostoc lactis

% ID

1.0

T

0.81

Test(s) à l'encontre

SAC 95%

[Fermer](#)

[Imprimer](#)

Lb3 :

02/05/2017

apiweb™ - Résultat d'identification



API 50 CHL V5.1



REFERENCE BENTOURA Amira DATE 15/01/16
COMMENTAIRE Identification de la souche Lb3 par la galerie API50CHL

EXCELLENTE IDENTIFICATION

Galerie API 50 CHL V5.1
Profil
Note(s)

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.89	TAG 7%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Lactobacillus pentosus	0.1	0.32	GLY 75% DXYL 100% MDM 1% MLZ 25% TAG 1%

Fermer

Inprimer

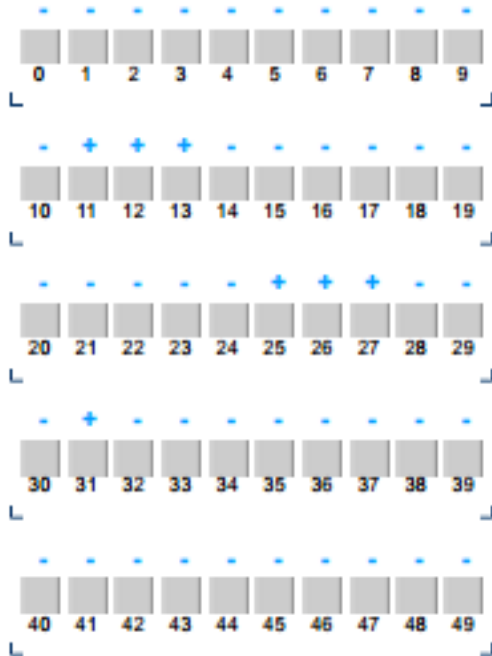
Lb4 :

02/05/2017

apiweb™ - Résultat d'identification



API 50 CHL V5.1



REFERENCE BENTOURA Amira DATE 15/01/16

COMMENTAIRE Identification de la souche Lb4 par la galerie API50CHL

TRES BONNE IDENTIFICATION AU GENRE

Galerie API 50 CHL V5.1
Profil++++.....++++.....
Note(s)

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Lactobacillus acidophilus 3	71.1	0.78	NAG 75% MAL 75%
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	28.1	0.71	ESC 24% SAL 10% CEL 10% MAL 75%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre
Pediococcus damnosus 2	0.3	0.48	GAL 85% AMY 75% SAC 1% GEN 99%

Fermer

Imprimer

A decorative border consisting of a repeating pattern of stylized floral motifs, possibly resembling a camera shutter or a similar geometric design, arranged in a continuous line around the perimeter of the page.

Publication

Full Length Research Paper

Antagonistic effect of lactobacilli isolated from camel (*Camelus dromedarius*) milk on food borne pathogens

Amira BENTOURA, Malek AMIALI, Mohammed Yehya El Amin AISSIOU and Arezki BITAM*

Research Laboratory of Food Technology and Human Nutrition, École Nationale Supérieure Agronomique, Hassan Badi, El Harrach-Alger 16000, Algérie.

Received 26 February, 2017; Accepted 5 April, 2017

Camel milk is a suitable substrate for the growth of protective bacterial flora. Detection of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances from camel (*Camelus dromedarius*) milk in south Algeria against some food-borne pathogens is the subject of this work. Morphological, physiological and biochemical tests have identified four *Lactobacillus* isolates belonging to the following species: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. In order to demonstrate the inhibitory effect of these bacteria *in vitro*, their antagonistic property was tested against six pathogenic strains often involved in food-borne illness: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri* using the disc diffusion method. The antagonistic effect was manifested by the appearance of inhibition zones around the discs. The potential inhibitor was estimated by calculating diameter of inhibition zones which extend from 02 to 16 mm. All *Lactobacillus* isolates secreted into the culture medium inhibitory substances were able to inactivate the growth of pathogenic strains tested. *L. plantarum* has shown the largest inhibition zone against *S. aureus* (16 mm). These two strains were chosen to determine the nature of *L. plantarum* secreted substances responsible for the antagonistic effect. The obtained results have shown that *L. plantarum* inhibitory property against *S. aureus* resulted from the combined effect of several biological agents originating from their metabolic activities, especially organic acids and bacteriocins.

Key words: Antagonism, camel milk, Lactobacilli, food borne pathogens, mixed culture, pure culture.

INTRODUCTION

Food borne pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* are the cause of various pathologies and food borne illness. Pasteurization, fermentation and refrigeration are mostly used to preserve and prolong the shelf-life of food

products. However, these methods do not constitute a sufficient guarantee to fight against microbial contamination. Excessive and uncontrolled use of chemical additives may create health risks for the consumer (Mami et al., 2010). Lactic acid bacteria have

*Corresponding author. E-mail: a.bitam@ensa.dz.

been used successfully, with few adverse effects to prevent antibiotic associated diarrhea, to treat severe infantile diarrhea and to treat various diarrheal illnesses (Tadesse et al., 2005). Several studies have exploited microbial interactions to protect food quality and to fight against undesirable microorganisms (Allouche et al., 2010). Hence search for new strains of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances is a universal objective for creation of lactic leaven intended for a better food bio-preservation (Mami et al., 2010; Franz et al., 2010).

It has been shown that camel milk possesses a specific protective system, powerful against contamination flora. This system is composed of antagonistic substances such as protective proteins ((lysosomes, lactoperoxidases and lactoferrin), organic acids, hydrogen peroxide (H₂O₂), bacteriocins produced by lactic acid bacteria which limit the growth of certain pathogenic microbes (Barbour et al., 1984; Klaenhammer et al., 1994; Siboukeur, 2007; Jrad et al., 2013). However, only few studies reported the effect of lactic acid bacteria isolated from camel milk on pathogenic bacteria. Therefore, the aim of this study was to highlight lactic strains isolated from camel (*Camelus dromedaries*) milk belonging to nomads in the Wilaya of Ouargla (South Algeria) and to evaluate *in vitro*, their antimicrobial activities against various pathogenic strains encountered in dairy products and involved often in food-borne diseases.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Milk sample

The collection of milk was carried out on a camel (*C. dromedaries*), belonging to nomads in the wilaya of Ouargla (South Algeria), 6 years old, after her first pregnancy and one calving.

Pathogenic strains

The antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from camel milk was tested on the growth of the following pathogenic strains: *Salmonella enteritidis* (ATCC 25928), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 4157), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) and *Shigella flexneri* (ATCC29903) obtained from Microbiology Laboratory of Saidal Group and Microbiology Laboratory of Pasteur Institute, Algiers.

Isolation and identification of lactic acid bacteria from camel milk

The isolation was performed on Man-Rogosa and Sharp (MRS) agar, medium suitable for specific research of Lactobacilli. The cultures were incubated for 48 to 72h at 30°C under anaerobic conditions. The purification was done by carrying successive streaking of individual colonies on MRS agar and incubation at 30°C for 48 h until colonies with same size, shape, color, were

obtained, indicating therefore the purity of the strain. The identification was based on the determination of macroscopic characters (colonies aspect on MRS agar), microscopic characters (shape, Gram reaction, mobility and sporulation), physiological characters (catalase test, the growth at different temperatures, salt tolerance and production of CO₂) and biochemical characters (fermentation of carbohydrates using the API 50 CH gallery). The fermentation results of the 49 sugars in the API50CH gallery were treated by ApiWeb software (BioMérieux) to identify lactic acid bacteria with a similarity rate of 100% (Alaoui et al., 2016). The conservation of the pure strains was performed on inclined solid medium (MRS agar). Then, the cultures were maintained at 4°C and every four weeks, the strains were inoculated in new medium (MRS agar).

The antagonism test

Preparation of bacterial pre-cultures

A young lactic culture of 18 h of each isolate was inoculated into a test tube containing 10 mL of MRS broth. The tube was then incubated at 37°C for 18 h under anaerobic conditions. The pathogenic strains were each inoculated in a test tube containing 10 mL of nutrient broth and incubated at 37°C for 18 h.

Standardization of bacterial pre-cultures

The inoculum size of each pathogen and lactic acid bacteria was standardized against the McFarland turbidity standard No. 0.5 using a spectrophotometer at a wave length of either 600 or 625 nm. The McFarland 0.5 standard was used in the preparation of standardized bacterial inoculums for the susceptibility test to antimicrobial agents. It corresponds approximately to a homogenous bacterial suspension of 1.5 x 10⁸ cells/mL (McFarland, 1907).

Detection of antagonism by the disc diffusion method

This method consists of pouring 20 mL of Tryptic Soja Agar (TSA) medium into sterile Petri dishes. After solidification, the dishes were flooded with 1 mL of pathogenic strains pre-cultures. After drying, sterile filter discs (9 mm) were dipped in the lactic acid bacteria pre-cultures incubated for 18 h and placed on solidified TSA agar seeded with test microorganisms pre-cultures. The diffusion of substances responsible for bacterial interactions was improved by incubation at 37°C for 24 h (Tadesse et al., 2005).

Estimation of inhibitory potential of lactic acid bacteria

The antimicrobial activity is revealed by the appearance of inhibition zones around the discs. Inhibition zones (Z_i) were measured according to the Equation 1.

$$Z_i(\text{mm}) = \text{Inhibitory zone diameter (mm)} - \text{Disc diameter (09 mm)} \quad (1)$$

According to Guessass (2007), a positive result is when the inhibition zone diameter (Z_i) is greater than 2 mm. Antibacterial activity tests were done in triplicates and the mean values were recorded.

Confirmation of the inhibition and determination of the inhibitor nature

The antibacterial activity was confirmed *in vitro* by a test on

Table 1. Morphological characteristics of camel milk isolates.

Groups	Morphological characteristics			
	Size	Shape	Colour	Contour
1	Medium (2 à 3 mm)	Circular and flat	Whitish	Regular
2	Small (1 mm)	Lenticular and cambered	Yellowish	Regular

reconstituted bovine milk in interaction conditions between the two types of microorganisms (lactic acid bacteria of camel milk and pathogenic bacteria). The experiment was carried out with lactic strains that showed the greatest inhibitor potential (high value of Z_i). For that, a sterile sample of 150 mL reconstituted bovine milk was sterilized at 120°C for 20 s then contaminated with 1 mL of *S. aureus* pre-culture. After, the contaminated sample was divided into three series of tubes. In tube 1, the sample was directly incubated at 37°C for 8 h (Pure culture). In tube 2, the contaminated bovine milk, was inoculated with 1 mL of *L. plantarum* pre-culture (Lb3) and incubated at 37°C for 8 h (mixed culture); whereas, the contaminated sample in tube 3 was inoculated with 1 mL of neutralized supernatant of *L. plantarum* pre-culture resulting from centrifugation at 8000 rpm for 10 min at 4°C (Siboukeur and Siboukeur, 2013). The resulting supernatant was adjusted to pH 6.5 with NaOH (1 N) to remove the antibacterial activity which could be exerted by organic acids and incubated in the same conditions (Jrad et al., 2013). Growth and variation in cell number of *S. aureus* in pure and mixed cultures were estimated by counting the colonies of *S. aureus* on Chapman agar every 2 h of the incubation period for the 3 series. For that, decimal dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of each sample were made. Only the dishes containing between 30 and 300 colonies were taken into consideration (Guessas et al., 2006). A volume of 0.1 mL from the dilution 10^{-1} for each sample was plated on the surface of the Chapman agar in order to count *S. aureus* colonies (Kaban et al., 2006). The colonies were counted to determine the number of CFU/mL using the following equation:

$$\text{The number of colonies} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) = \text{Colonies number} * \frac{1}{V} * \frac{1}{D}$$

V: The inoculated volume, D: concerned dilution.

The final result of colonies count was converted into logarithm (Log_{10} cfu / mL) according to the established recommendations of Alomar et al. (2008). In this experiment, the authors aimed to confirm the inhibition of *S. aureus* by *L. plantarum* by comparing the variation in *S. aureus* cells number during 8 h of incubation in pure culture (series 1) and mixed culture (series 2 and 3).

Then, in order to show the nature of the agents responsible for the inhibition of *S. aureus* by *L. plantarum*, the authors tried to show the effect of organic acids produced by *L. plantarum* in first stage, and to eliminate the effect of these organic acids by neutralizing the supernatant of *L. plantarum* pre-culture with NaOH (1N) to prove the existence of the inhibiting agents other than the organic acids. The enumeration of viable *S. aureus* cells and pH measurement were done in triplicate every 2 h from the dilution 10^{-1} for the three series and the mean values were recorded.

Statistical analysis

Microsoft Excel software (Microsoft Excel 2010) was used to plot the curve of inactivation. Experiments were done in triplicates and the means of the three data sets are presented. Analysis of variance was performed using statistical software SPSS. In all cases, significant difference was based on the 5% level ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Isolation and identification of lactic acid bacteria from camel milk

Macroscopic appearance

In the present study, a total of 32 isolates were recovered on MRS agar medium from camel milk sample. They were divided into two groups with different morphological characteristics as shown in the Table 1.

Microscopic appearance

Gram reaction revealed that among the 32 isolates, 14 were retained as Gram (+), rod shaped, individual, in pairs and in chains. Therefore, Lactobacilli was potentially isolated as shown in Figure 1.

Biochemical characterization

Among the 14 Gram (+) isolates, four of them were catalase (-) and were retained. The results of morphological, physiological and biochemical tests of isolated Lactobacilli from camel milk are shown in Table 2.

The macroscopic, microscopic and physiological characteristics showed that all camel milk isolates belong to the genus *Lactobacillus*. Fermentation of carbohydrates using API 50 CH Gallery system showed that *Lactobacillus* isolates belong to the following species: *L. fermentum* (Lb1), *L. helveticus* (Lb2), *L. plantarum* (Lb3) and *L. acidophilus* (Lb4). This biochemical identification was based on the comparison with fermentation profiles of Biomerieux database for these species with 100% similarity.

Results of antagonism

The antagonistic effect was manifested by the appearance of clear and translucent inhibition zone around the discs. Diameter of inhibition zones produced by *Lactobacillus* isolates on the test pathogenic strains are shown in Table 3.

All *Lactobacillus* isolated from camel milk inhibited the

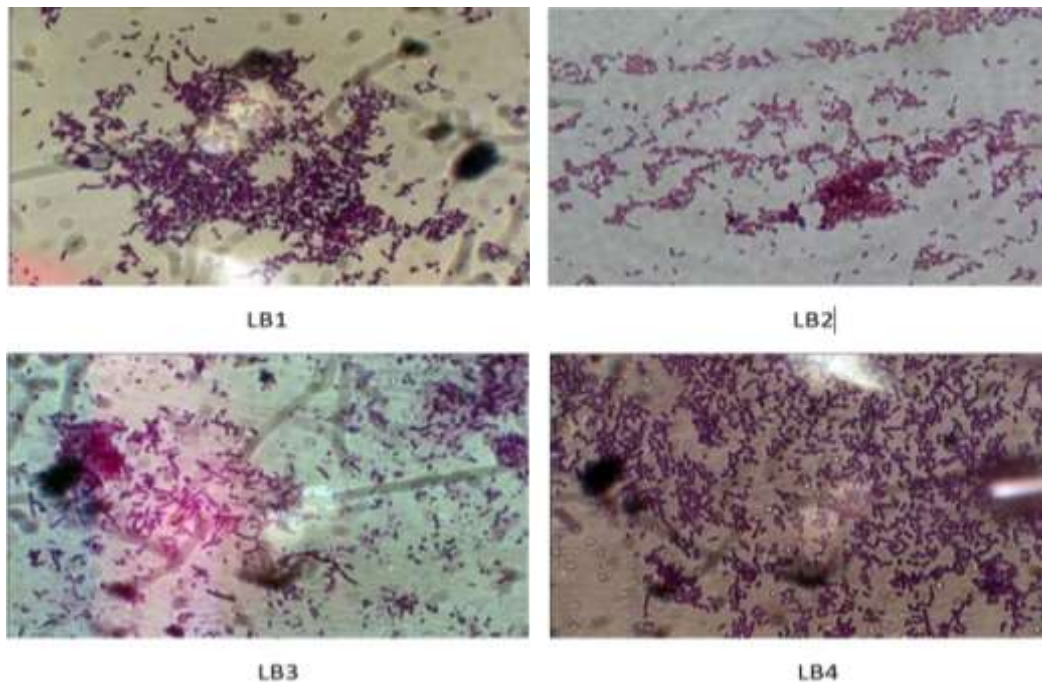


Figure 1. Microscopic appearance of lactobacilli isolates from camel milk after Gram staining (G x 100). Lb1: *L. fermentum*, b) Lb2: *L. helveticus*, c) Lb3: *L. plantarum*, d) Lb4: *L. acidophilus*.

Table 2. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the Lactobacilli isolated from camel milk.

Morphological, physiological and biochemical characters	Isolated lactic strains			
	Lb1	Lb2	Lb3	Lb4
Gram	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-
Morphology	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Gas production (CO ₂)	+	-	-	-
Growth at 10°C	-	-	+	-
Growth at 45°C	+	+	-	+
Growth at 2% NaCl	+	+	+	+
Growth at 4% NaCl	+	+	+	+
Growth at 6.5% NaCl	+	+	+	+
Thermoresistance at 60°C/30 min	+	+	+	+
Arginine hydrolysis (ADH)	+	-	+	-
Esculin hydrolysis	-	-	+	+
Sugar fermentation	Glucose	+	-	+
	Raffinose	+	-	+
	Lactose	+	+	+
	Cellubiose	+	-	+
	Mannitol	+	-	+
	Arabinose	+	-	+
	Xylose	+	-	+

(+): Positive reaction; (-): negative reaction.

growth of all pathogenic strains tested to varying degrees, except Lb1 which was inactive against *B.*

subtilis. This concluded that *Lb. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum* and *L. acidophilus* are characterized as

Table 3. Diameter of inhibition zones (mm) produced by *Lactobacillus* isolates on the tested pathogenic strains assessed by the disc diffusion method (essays are in triplicates).

Pathogenic strains	Lactobacilli isolates	Diameters of the inhibition zones (mm)
		Mean \pm standard deviation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lb1	12.66 \pm 1.52
	Lb2	11 \pm 2
	Lb3	16 \pm 2
	Lb4	10.33 \pm 0.57
<i>Bacillus subtilis</i>	Lb1	0
	Lb2	8.3 \pm 3.51
	Lb3	2 \pm 2.64
	Lb4	7.33 \pm 0.57
<i>Salmonella enteritidis</i>	Lb1	10 \pm 1.73
	Lb2	11 \pm 2
	Lb3	13 \pm 1.73
	Lb4	14.5 \pm 1.41
<i>Escherichia coli</i>	Lb1	5.6 \pm 1.52
	Lb2	7.6 \pm 1.52
	Lb3	10 \pm 1
	Lb4	5.3 \pm 0.57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lb1	10 \pm 1
	Lb2	12.33 \pm 0.57
	Lb3	11 \pm 1
	Lb4	12 \pm 1.73
<i>Shigella flexneri</i>	Lb1	12.33 \pm 0.57
	Lb2	10.33 \pm 1.52
	Lb3	14.66 \pm 0.57
	Lb4	11 \pm 1.73

producers of inhibitory substances against pathogenic strains. The inhibition zones are clear with distinct borders; diameters of inhibition zones varied from 02 (lower activity observed for *L. plantarum* against *Bacillus subtilis*) to 16 mm (higher activity observed for *L. plantarum* against *S. aureus*). Therefore, *L. plantarum* was retained as the strongest inhibitor against the tested pathogenic strains.

Confirmation of the inhibition and determination of the inhibitor nature

Confirmation of the inhibition

The growth kinetics of *S. aureus* in the presence and absence of *L. plantarum* is shown in Figure 2. The bacterial count was carried out every 2 h during 8 h of treatment at 37°C. In the sample of tube 1 (reconstituted milk + *S. aureus*), the survival fraction of *S. aureus* did

not significantly increase or decrease since the contaminated milk was not treated by Lb3.

However, when comparing the bacterial count of tube 2 (reconstituted milk + *S. aureus* + *L. plantarum*) and 3 (reconstituted bovine milk + *S. aureus* + *L. plantarum* + NaOH 1N) to tube 1, a drastic *S. aureus* reduction was noticed just after 2 h of treatment. The number of viable cells per milliliter declined from 4.42 to 2.9 log₁₀ cfu/mL for the tube 2 and 2.69 log₁₀ cfu/mL for tube 3 after 4 h of treatment. And *S. aureus* cells number became less than 2 log₁₀ cfu/mL within 6 and 8 h for the tubes 2 and 3, respectively (Figure 2). These differences were not statistically significant on the 5% level ($p \geq 0.05$), ($0.77 > 0.05$) and ($0.87 > 0.05$).

Nature of inhibitor

The milk pH measurement was done every 2 h of treatment. A pH decrease was shown in Figure 3 for the

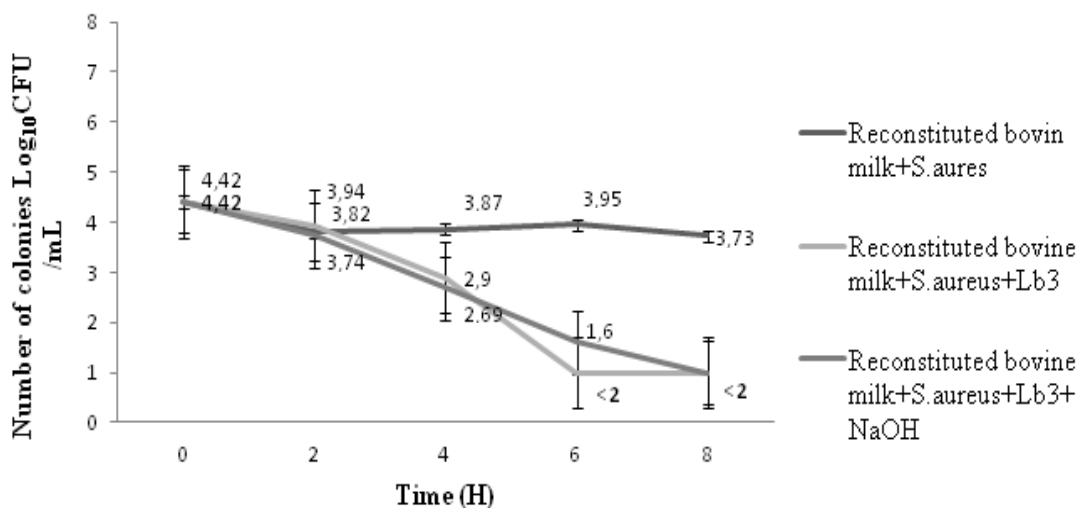


Figure 2. Kinetics of growth of *S. aureus* in pure and mixed cultures with *Lb. Plantarum* in reconstituted bovine milk.

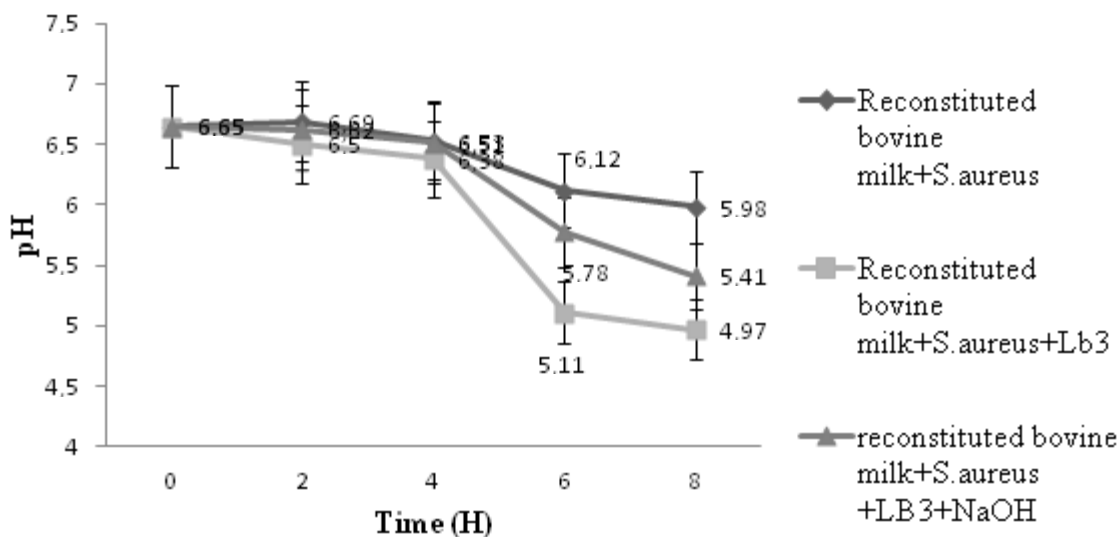


Figure 3. Evolution of pH versus time in pure and mixed culture of *S. aureus* with *Lb. plantarum*.

three milk samples (tubes 1, 2 and 3). In tube 1 (untreated sample), pH was changed insignificantly during 8 h of incubation. In contrast, for tubes 2 and 3 (treated samples), pH decreases considerably from the 4th h to reach a value of 4, 97 and 5, 41 respectively. These differences were not statistically significant on the 5% level ($p \geq 0.05$), ($0.81 > 0.05$ and $0.56 > 0.05$).

DISCUSSION

In the present study, a total of 32 lactic acid bacteria were

isolated from raw camel milk sample. Morphological, physiological and biochemical tests identified four *Lactobacillus* isolates belonging to the following species: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum* and *L. acidophilus*. Carbohydrate degradation tests by the API 50 CH galleries allowed us to differentiate these *Lactobacillus* species with fermentation profiles of 100% similar to those given by ApiWeb software (BioMérieux) for these same species. The positive reading is given by a change of the color under the effect of pH variation in the API 50 CH galleries wells. These classic galleries API 50 CH were used to differentiate 15 *Lactobacillus* isolates

from the 112 lactic isolates of camel milk that belonged to the species: *L. brevis*, *L. delbrueckii* and *L. fermentum* in the work of Alaoui et al. (2016). Similar to our findings, *L. fermentum* (Lb1) isolated in this study were among the lactobacilli isolated from camel milk in the work of Khandelwal et al. (2015) and Alaoui et al. (2016). For *L. helveticus* (Lb2) and *L. acidophilus* (Lb4), they were isolated from goat milk in the work of Badis et al. (2005), and isolation of *L. plantarum* (Lb3) from raw goat milk and raw camel milk was described in several studies (Guessass and Kihal, 2004; Badis et al., 2004 a, b; Mami et al., 2008). All *Lactobacillus* isolated from camel milk inhibited the growth of majority of the tested pathogenic strains in varying degrees. The inhibition zones of diameter of *L. fermentum* (Lb1) against the tested pathogenic strains varied from 5.6 to 12.66 mm. The greatest inhibition recorded was against *S. aureus* without any inhibition against *B. subtilis*. Foster and Hall (1991) reported that some microorganisms produce an acid-tolerance response system that protects them against severe acid stress for longer periods. According to Cogan et al. (1997), the good acidifying lactic acid bacteria are those which are able to reduce the pH of the milk from its initial value of approximately 6.6 to 5.3 over a period of 6 h. However, the pH variation technique (Δ pH) allows classifying the lactobacilli into rapidly acidifying strains, with medium acidification rate and low acidification rate. On this basis and from the data shown in Figure 3, *L. fermentum* was able to reduce the pH of bovine milk from 6.65 to 5.11 after 6 h of incubation (severe acid stress). Therefore, *L. fermentum* is a rapidly acidifying strain. This may be the reason for resistance of *B. subtilis* to *L. fermentum* as compared to the other tested strains which probably belong to the other less acidifying categories. For *L. helveticus* (Lb2), inhibition zones diameters varied from 7.6 to 12.33 mm. In comparison with the work of other investigators that reported the weak antibacterial activity against *P. aeruginosa* by *L. casei* and *L. bulgaricus* isolated from various foods (Nigatu et al., 2015), the current results showed good inhibitory effect against *P. aeruginosa* by *L. helveticus*. Whereas, *L. helveticus* (Lb2) was more active against *E. coli* as compared to those isolated from cow's milk in the work of Allouche et al. (2010). For *L. acidophilus* (Lb 4), inhibition zones diameters varied from 5.3 to 14.5 mm. The greatest inhibition was against *Salmonella enteritidis*. Itoh et al. (1995) and Tahara and Kanatani (1996), showed that it is also possible that *L. acidophilus* exerts inhibitory activity only against bacteria taxonomically closest to the producing strain. *L. plantarum* (Lb3) showed the larger zone of inhibition against *S. aureus* (16 mm). The inhibition of *S. aureus* and *E. coli* by *L. plantarum* isolated from goat milk have already been described by Mami et al. (2008), Todorov et al. (2004) and Karthikeyan and Santosh (2009). According to Trias et al. (2008), the diameter of the inhibition zones varies with the type of culture medium

used and the species used as a target strain or indicator strain.

In series 1 (untreated sample), the survival fraction of *S. aureus* did not significantly increase or decrease during the incubation period. The low growth of *S. aureus* in untreated sample of reconstituted bovine milk medium can be explained by the existence of an intrinsic antimicrobial activity of the lactic acid bacteria found in this milk against *S. aureus*. In contrast, the important reduction in *S. aureus* cells number ($\text{Log}_{10}\text{cfu/mL} < 2$) in mixed culture with *L. plantarum* (series 2 and 3) after 8 ho of treatment confirmed the bactericidal effect of *L. plantarum* on *S. aureus*. This same event was observed after 72 h in the work of Mami et al. (2008). According to Lairini et al. (2014), *Lactobacillus* are rapidly acidifying strains. The observed decrease in pH for the series 2 and 3 resulted from the production of organic acids (lactic and acetic acid) by *L. plantarum* isolated from camel milk. However, for series 1 (untreated sample), pH reduction was due to acid production by *S. aureus*. The inhibition of *S. aureus* in parallel with the pH decrease in the medium means that the acidity caused by organic acids produced by *L. plantarum* is an inhibitory agent for the growth of *S. aureus*. This decrease in pH has as consequence, a significant inhibition of *S. aureus* (less than 2 $\text{Log}_{10}\text{cfu/mL}$) from the 6th h of treatment for series 2. McLean and McGroarty (1996) showed that about 60% of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria was removed when the filtrates were neutralized to pH 6.5 with NaOH. However, addition of the neutralized *L. plantarum* pre-culture supernatant to the *S. aureus* culture has only delayed this event (charge less than 2 $\text{Log}_{10}\text{cfu/mL}$) in series 3. It can be concluded that organic acids are probably not the unique agent responsible for this phenomenon, other metabolites could be implicated. Inhibition of *S. aureus* by the production of hydrogen peroxide is excluded because this one has a catalase (Alomar et al., 2008). The H_2O_2 released by lactic acid bacteria strains inhibit bacteria which do not possess defenses against oxidative stress (Ouweland and Vesterlund, 2004). The production of bacteriocins by *L. plantarum* is widely accepted (Ouweland and Vesterlund, 2004; Todorov et al., 2004; Karthikeyan and Santosh, 2009). Therefore, inhibitory properties of *L. plantarum* against *S. aureus* are also owed to the production of bacteriocins. *Lactobacillus* strains isolated from camel (*Camelus dromedaries*) milk in this study showed different inhibitory activities against the tested pathogenic strains, this can also be explained by the quantity and the structural variability of bacteriocins produced (Richard, 1996).

The results obtained showed that the antibacterial property of *L. plantarum* isolated from camel milk against *S. aureus* result from the synergistic (combined) effect of several biological factors originating from their metabolic activities, especially the organic acids and unknown bacteriocins.

Conclusion

Lactic acid bacteria isolated from camel milk in this study are able to produce antibacterial substances to eliminate the presence of tested pathogenic bacteria. Camel milk differs from milk of other species by the presence of a powerful protector system; it constitutes a source of new antimicrobial strains. It appeared that the synergistic effect of several biological factors originating from their metabolic activities (organic acid, bacteriocins, H₂O₂) produced by lactic acid bacteria derived from camel milk was responsible for the self-purification effect of stored camel milk which is kept for many hours in relatively high temperatures (about 28°C). This study showed also the inhibitory activity of lactic acid bacteria derived from camel milk observed *in vitro* against pathogenic species that may accidentally contaminate milk, indicating the possibility of exploiting this activity for use as a means of food bio-preservation and to preserve the health of the consumer against pathogenic bacteria involved in food poisoning deemed in the summer season.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Alaoui Ismaili M, Guilal J, Hamama A, Saidi B, Zahar M (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *Int. J. Multi-disciplinary Sci.* 1(1):81-94.
- Allouche FN, Hellal A, Laraba A (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Rev. Nat. Technol.* 3:13-20.
- Alomar J, Loubiere P, Delbes C, Nouaille S, Montel MC (2008). Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.* 25(3):502-508.
- Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjemaa B, Henni DE, Tornadijo ME, Kihal M (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21(3):343-349.
- Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjemaa B, Henni DE, Kihal M (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21(5):579-588.
- Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout MR (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Sci. Technol.* 23:30-37.
- Barbour EK, Nabbut NH, Frerichs WN, Al Nakhli HM (1984). Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysosome and stage of lactation. *J. Food. Prot.* 47(11):838-840.
- Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-salvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Gomez R, Kalanzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC, Rodriguez (1997). Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64(3):409-421.
- Foster JW, Hall HK (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173(16):5129-5135.
- Franz CMAP, Cho GS, Holzapfel WH, Galvez A (2010). Safety of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.* pp. 341-360.
- Guessass B (2007). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran Es-Senia. Algérie.
- Guessass B, Kihal M (2004). Characterization of lactic acid bacteria from Algerian arid zone raw goat's milk. *Afr. J. Biotechnol.* 3(6):339-342.
- Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Satto T (1995). Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*. *Lett. App. Microbiol.* 21(3):137-141.
- Jrad Z, El Hatmi H, Fguiri I, Arroum S, Assadi M, Khorchani T (2013). Antibacterial activity of Lactic acid bacteria isolated from Tunisian camel milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(12):1002-1008.
- Kaban G, Kaya M (2006). Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Control* 17(10):797-801.
- Karthikeyan V, Santosh SW (2009). Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3(5):233-239.
- Khandelwal D, Joshi H, Chaudhary BL (2015). Antagonistic effect of Lactobacilli of Camel Milk against *Aeromonas veronii* isolated from Pichola lake, Udaipur, Rajasthan, India. *Res. J. Rec. Sci.* 4:170-172.
- Klaenhammer TR, Fremaux C, Hechard Y (1994). Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques. In: De Roissard and Luquet (Eds), *Bactéries Lactiques I. Tech. Doc, Lavoisier, Paris.* Pp. 353-365.
- Lairini S, Beqqali N, Bouslamti R, Belkhou R, Zerrouq F (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afr. Sci.* 10(4):267-277.
- Mami A, Hamedi AR, Henni JE, Kerfouf A, Kihal M (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *Les technologies de laboratoire.* 5:26-33.
- Mami A, Henni JE, Kihal M (2008). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus Species* isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World. J. Dairy Food. Sci.* 3(2):39-49.
- McFarland J (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 49(14):1176-1178.
- McLean NW, McGroarty JA (1996). Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):1089-1092.
- Nigatu JM, Tuji FA, Tefera AT (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk *ergo*, against some food-borne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese *ayib*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 9(29):1789-1797.
- Ouwehand AC, Vesterlund S (2004). Antibacterial components from lactic acid bacteria. *Food Science and Technology, New York.* Marcel Dekker. 139:375-396.
- Richard J (1996). Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs : mythe ou réalité ? *Le lait.* 76(1-2):179-189.
- Siboukeur A, Siboukeur O (2013). Effect of Cameline Nisin isolated from *Lactococcus lactis* sub sp. lactis on *Staphylococcus aureus* sp. *Emir. J. Food Agric.* 25(5):398-402.
- Siboukeur O (2007). Etude du lait camelin collecté localement : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitude à la coagulation. Thèse de Doctorat. INA.
- Tadesse G, Ephraim E, Ashenafi M (2005). Assessment of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. *Internet J. Food Saf.* 5:13-20.
- Tahara T, Kanatani K (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol.* 81(6):669-677.
- Todorov SD, Van Reenen CA, Dicks LMT (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50(3):149-157.
- Trias R, Bañeras L, Badosa E, Montesinos E (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against food-borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 123(1):50-60.