



REPUBLIQUE ALGERINNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Master académique

En Microbiologie Cellulaire et Moléculaire

Thème

Mise en évidence de l'activité antibactérienne et enzymatique des bactéries lactiques isolées à partir de lait camelin du sud-est algérien

Devant le jury :

Président : DAROUICHE F. (MAA, UALK)

Examineur : ZRAIEB A. (MAB, UALK)

Examineur : LEULMI N. (MAB, UALK)

Rapporteur : MERABTI R. (MAA, UALK)

Présenté par :

**MARIR FATMA
BADAOUI IMAN**

2012-2013

Dédicace

Merci Allah de m'avoir donné la capacité, la force et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire

"Ya Kayoum".

Je dédie le fruit de mes 17 bougies d'études aux plus précieux des trésors :

Mes parents : ma tendre maman et mon cher papa,

Qui m'ont donné la vie

Qui m'ont appris tout ce que je sais

Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort.

Mon cher frère : Imed que dieu le garde.

Mes très chères sœurs : Nadjela, son mari Samir, Sana et les deux petites : Soundousse et Siline.

À toute ma famille surtout mes chers oncles et mes tantes ainsi que leur famille ; à chaque cousin et cousine.

À ma sœur, mon binôme, Fatma (youyou), qui m'a supporté durant ces dernières années. Et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin ; aussi à sa famille surtout sa mère que j'aime beaucoup (tata Nabila).

À mes très chères et adorables amies : Aya, Afaf, Jida, Kahina et Saliha pour leurs fidélité, leurs aide et tous les bons moments que l'on a passé ensemble.

À tous mes amis (es) de la promotion 2008-2013 avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Mon plus profond respect va tout droit à mon professeur M^{elle} Merabti Ryma pour l'effort fourni.

À tous mes professeurs qui mon éclairé la voie du savoir.

IMEN.

Remerciement

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier :

Notre respectée encadreur M^{elle} Merabti Ryma, pour son encadrement, ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques qui nous auront aidés tout au long de ce travail. Merci pour son soutien, ses nombreux encouragements et sa confiance.

Les membres de jury, Que chacun d'entre eux soit vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter, de participer à ce jury, et le plaisir d'assister à notre soutenance. Recevez, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt qui a été porté à ce travail.

Nous adressons un grand remerciement à l'ensemble des étudiants de master 2 microbiologie notamment : Aya, Afaf, Kahina, Hadjar, Karima, Aicha, Lamia, Salîha , Chahra , Nadia, Hanane, ainsi que tous les étudiants du département de biologie.

Nous tenons à remercier aussi ,

Le personnel de l'institut universitaire de biologie de la wilaya de Khenchela.

Nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Enfin, nous n'oublions pas de dire merci à nos familles car sans eux ce travail n'aurait pas vu le jour, et à tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de notre profonde gratitude.

FATMA ET IMEN.

Dédicaces

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire

"Ya Kayoum".

Je dédie ce modeste travail

A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère.

Que dieu les gardes et les protège.

A mes adorables sœurs Insaf, Baraa Yasmine et Roufaïda, mes sincères affections.

Que dieu vous accorde sa grâce et vous guide dans le droit chemin

A mon cher frère ACHRAF, pour son aide et sa compréhension.

Que dieu le protège.

A mes cousins et cousines, surtout lina, manel, oumaïma, marwa et à mes oncles et tantes ainsi que toute ma famille, parce que même si on ne la choisit pas, la mienne est exceptionnelle.

A mon binôme et sœur Imen, et à toute sa famille que notre complicité dure encore longtemps.

A mes amies, KAHINA, SALIHA, ASMA, surtout AFEF et Aya pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble et qui ont, sans aucun doute, contribué au bon déroulement de ma vie pendant ces 5 dernières années et par conséquent à la réussite de cette thèse, et à toute la promotion microbiologie master 2011-2013.

A mon respectée encadreur M^{elle} Merabti Ryma pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi.

A tous mes professeurs, qui m'ont donnée la base des sciences.

FATMA.

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Les principaux constituants du lait.....	2
Figure 2 : La valeur nutritive du lait.....	7
Figure 3 : Le beurre.....	15
Figure 4 : Le fromage	15
Figure 5 : Le yaourt.....	15
Figure 6: Part du lait dans la consommation totale de protéine dans certains pays.....	15
Figure 7 : <i>Lactobacillus Rosell-11</i> observé au microscope électronique à transmission.....	18
Figure 8 : <i>Leuconostoc lactis</i> observé au microscope électronique à transmission.....	18
Figure 9 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	21
Figure 10: Voies fermentaires de la dégradation du glucose.....	24
Figure 11 : Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.....	26
Figure 12 : Séquence et structure de l'antibiotique de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un antibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2).....	35
Figure 13 : L'enveloppe des bactéries à Gram négatif à et Gram positif.....	38
Figure 14 : Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous groupes 1/ 2 et 3 dans la membrane plasmique de la bactérie cible.....	41
Figure 15 : La nisine.....	45
Figure 16 : Schéma du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i>	49
Figure 17 : Carte topographique montre localisation de Bir el Ater dans la wilaya de Tébessa.....	52

Figure 18 : Méthode de dilutions décimales et isolement à partir de ces dilutions.....	52
Figure 19 : Exemples des résultats d'isolement des bactéries lactiques sur MRS, à partir d'échantillon de lait camelin.	58
Figure 20 : Exemples de résultats de la coloration de Gram.de quelques isolats	60
Figure 21 : Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL6 et BL7contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853).....	62
Figure 22 : Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL34 et BL40 contre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	63
Figure 23 : Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL34 et BL40 contre <i>Klebsiella sp.</i>	64
Figure 24 : Activité protéolytique des bactéries lactiques testées.....	68

Tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du lait.....	5
Tableau 2 : Teneurs moyennes des différents laits.....	11
Tableau 3 : Résultats de l'examen macroscopique.	57
Tableau 4 : Résultats des tests d'identification morphologique et physiologique.	59
Tableau 5 : Activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques évaluée en (mm) de diamètre de la zone d'inhibition	61
Tableau 6 : Résultats de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.	66

Liste des abréviations

Noms de genres bactériens

B : *bifidobacterium*

BL : bactéries lactiques

En : *Enterococcus*

H : *Helicobacter*

Lb: *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Li : *Listeria*

Ln: *Leuconostoc*

St : *Streptococcus*

T : *Trichomonas*

Unités de mesures

°C : Degré Celsius

°C : Degré celsius

°D : Degré dornic

cm, mm, nm, µm: Centimètre, millimètre, nanomètre, micromètre

g, mg : Gramme, milligramme

h: heure

kcal : Kilocalories

kDa : kilodalton

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

M, mM : Molaire, millimolaire

Min : minute

Ppm : partie par million

UFC : Unité Formant une Colonie

Ve : le volume d'ensemencement

Autres abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP: Adénosine diphosphate

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ATP : Adénosine triphosphate

C H₂O₂ : Peroxide d'hydrogène

C : Carbone

Ca : Calcium

CaCO₃ : Le carbonate de calcium

CHO : Le diacétyl

CO₂: Dioxyde de carbone

EPS : Exopolysaccharides

FAO: Food and Agriculture Organization

G+C: Guanine + cytosine

H₂O: L'eau

IgA : Immunoglobulines A

K⁺ : Le potassium

LAB: Lactic Acid Bacteria

MRS: Man-Rogosa et Sharp

N : Normalité

Na⁺: Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NAD⁺/NADH, H⁺: Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

NaOH: Hydroxyde de sodium

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Opp, Opt: Oligopeptides

P : Phosphate inorganique

pH : Potentiel d Hydrogène

PrtP : Protéase de paroi

sp : Espèce non précisée

ssp : Sous-espèce, soit sub-species

Fig : Figure

Liste Des Annexes

Annexe 1 : Protocole expérimentale.

Annexe 2 : Composition des milieux MRS.

Annexe 3 : Fabrication d'un râteau d'étalement.

Annexe 4: La méthode à la bougie (l'anaérobiose).

Annexe 5 : Coloration de Gram.

Annexe 6: Test catalase.

Annexe des photos.

Table des matières

Résumé N1

Liste des figures et tableaux..... N2

Liste des abréviations N3

Liste des annexes..... N4

Introduction générale.....1

Revue bibliographique

I- Le lait

1- Définition du lait.....3

2- Composition du lait.....3

3 - propriétés physico-chimiques du lait.....6

4 - Valeur alimentaire.....6

5- Microbiologie du lait8

5.1- Flore originelle.....8

5.2- Flore de contamination.....8

6- différents types de laits.....9

6.1- Lait de vache.....9

6.2- Lait de brebis et de chèvre9

6.3- Lait de chamelle.....10

a- Définition.....10

b- Comparaison entre le lait de vache et le lait de chamelle12

c- Microbiologie du lait de chamelle.....13

7 - Les produits laitiers.....14

a- Le lait fermenté.....14

b- Le beurre	14
c- Le lait battu	16
d- Le fromage.....	16
e- Le yaourt	16
8- Consommation du lait	16

II- Les bactéries lactiques

1- Présentation des bactéries lactiques	19
2- Habitat des bactéries lactiques	19
2.1- Culture des bactéries lactiques.....	19
2.2- Présences des bactéries lactiques à l'état libre dans l'environnement	20
2.3- Présence des bactéries lactiques en association avec l'hôte	20
3- Diversité et taxonomie des bactéries lactique.....	22
3.1- Origine des bactéries lactiques	22
3.2- Diversité des bactéries lactiques.....	22
3.3- Taxonomie des bactéries lactiques	22
4- Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	25
4.1- Voie homofermentaire ou EMP	25
4.2- Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	25
5- Rôle des bactéries lactiques.....	27

III- Activité antibactérienne et enzymatique des bactéries lactiques

A- Activité antibactérienne des bactéries lactiques (les bactériocines)

1- Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	28
1.1- Le pH et les acides organiques.....	28

1.2- Le peroxyde d'hydrogène.....	29
1.3- Le dioxyde de carbone	29
1.4- Le diacétyl	30
1.5- La reutérine	30
1.6- Les bactériocines	31
1.6.1- Définitions, généralités sur les bactériocines.....	31
1.6.2- Classification	33
a- Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques	34
b- Les bactériocines de classes II.....	40
1.6.3- Production et conditionnement des bactériocines	44
a- Production du bactériocine.....	44
b- Conditionnement	46
1.6.4- Application des bactériocine	47
a- Industrie agroalimentaire.....	47
b- Santé	47
1.6.5- Limites d'utilisation des bactériocine.....	48
B- Activité enzymatique des bactéries lactiques	
1- Aptitude protéolytique.....	50
2- Aptitude lipolytique	51
Matériel et Méthodes	
1- Isolement et sélection des bactéries lactiques.....	53
1.1- Origine de l'échantillon du lait à étudier.....	53
1.2- Isolement des bactéries lactiques	53
1.3- Examens macroscopiques, microscopiques et physiologiques.....	53
1.4- Coloration de Gram.....	54
1.5- Test de la catalase.....	54

2- Purification des colonies sélectionnées	54
3-Test de l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques sélectionnées.....	54
3.1- Les souches cibles	54
3.2- Test du pouvoir d'inhibition des souches cibles par la production de bactériocine.....	54
a- Préparation de l'extrait bactériocinogénique.....	55
b- Mise en évidence de l'activité bactériocinogénique.....	55
4- Test de l'activité enzymatique des souches de bactéries lactiques sélectionnées...	56
4.1- Test de l'activité protéolytique.....	56
4.2- Test de l'activité lipolytique.....	56

Résultats et discussion

1- Isolement et sélection des bactéries lactiques.....	58
1-1 Observation macroscopique.....	58
1-2 Observation microscopique.....	58
2- Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées	62
a- Pouvoir d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	62
b- Pouvoir d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	63
c- Pouvoir d'inhibition de <i>Klebsiella sp.</i>	64
3- Activités enzymatiques des bactéries lactiques.....	67
a- Pouvoir protéolytique.....	67
b- Pouvoir lipolytique.....	69
Conclusion.....	70

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Le lait est un aliment indispensable pour la vie. Il constitue un produit de base dans le modèle de consommation algérienne (**Yakhlef, 1989**). Le lait reste un véhicule potentiel de microbes indésirables pouvant causer des infections chez l'homme ou l'animal (**Fenlon, 1985**). En Algérie, le lait cru est transformé par la flore naturellement présente dans le lait en fromage (*jeben*), beurre cru (*zebda beldia*) ou rance (*smen*) et autres produits laitiers. Ces produits retiennent leurs qualités désirables même après une longue conservation à température ambiante.

Cette flore lactique fermente les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et, si les conditions de développement sont favorables, ces bactéries lactiques produisent des bactériocines comme la nisine. Elles contribuent à la modification de la texture, à la saveur des aliments par la production de composés aromatiques et son activité enzymatique (**Labioui et al., 2005**).

Le lait de chamelle, présente une composition en nutriments de base (protéines, lactose et acides gras) similaire à celle du lait bovin. En plus de cela, il se singularise par une teneur élevée en vitamine C (**Siboukeur, 2007**) et en niacine (**Sawaya et al., 1989**). Durant l'entreposage du lait de chamelle à température ambiante (fermentation spontanée), il a été constaté que le taux de bactéries lactiques augmentait et que celui des bactéries de contamination a tendance à diminuer (**Siboukeur, 2007**). En d'autres termes, la flore lactique indigène interviendrait dans la protection du lait contre la flore contaminante.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux bactéries lactiques présentes dans le lait de chamelle produit dans le sud est algérien. Le but de ce travail est dans un premier temps isoler et sélectionner ces bactéries puis rechercher celles qui ont une activité antibactérienne contre des souches cibles pathogènes. Les mêmes isolats sélectionnés seront testés pour leur potentiel d'hydrolyse enzymatique à savoir protéolytique et lipolytique.

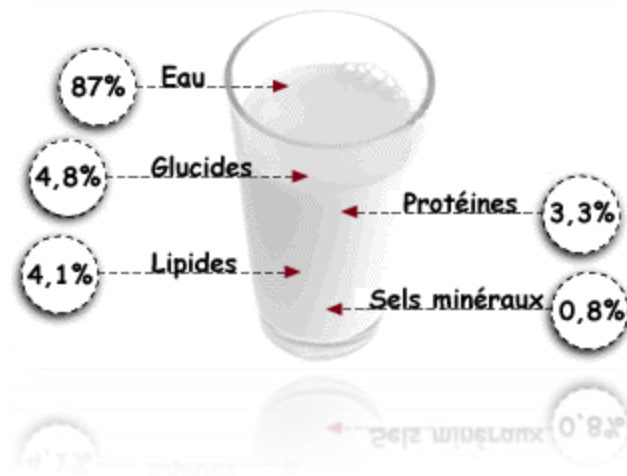


Fig 1. Principaux constituants du lait.

1-Définition du lait

La définition adoptée par le 1^{er} congrès international pour la répression des fraudes alimentaires tenu à Genève en 1908, pour le lait propre à la consommation humaine: «est le produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum» (**Evershed et al.,2008**).

Le lait est un liquide biologique de couleur généralement blanchâtre produit par les mammifères femelles. La lactation, fait pour les femelles de ces espèces de produire du lait, est une des caractéristiques définissant les mammifères. Le lait est produit par les cellules sécrétrices des glandes. Chez les mammifères téroïens, ces glandes sont contenues dans les mamelles. La fonction première du lait est de nourrir la progéniture jusqu'à ce qu'elle soit sevrée, c'est-à-dire capable de digérer d'autres aliments (**Evershed et al.,2008**). Les laits des différentes espèces de mammifères sont constitués des mêmes types de composants; mais leur composition varie d'une espèce à l'autre. On y trouve des globules de matières grasses en suspension dans une solution contenant le sucre du lait (lactose), des protéines (surtout la caséine) et des sels de calcium, de phosphore, de chlore, de sodium de potassium et de soufre, donc le lait est un produit équilibré d'un point de vue nutritionnel, adapté aux besoins de chaque espèce.

2- Composition du lait

Il apparaît comme un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en carotène de la matière grasse, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur légèrement sucrée. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable. Schématiquement, on peut considérer le lait comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sont à la forme colloïdale. L'eau est l'élément quantitativement le plus important, il représente environ le 9/10 du lait (**Afnor, 2001**) (**Fig.1**).

Les autres éléments constituent la matière sèche totale qui s'élève habituellement à 125-130g par litre de lait. La matière sèche dégraissée exprime la teneur du lait en éléments secs presque toujours voisine de 90g/litre. Certains composants sont présents en quantités

sensibles donc plus ou moins dosables (la matière grasse, le lactose, les matières azotés, les matières salines). D'autres, au contraire, ne figurent qu'à l'état de traces et sont plus difficilement appréciables (les enzymes, les pigments et les vitamines) (**Evershed et al., 2008**).

- La matière grasse varie en fonction des conditions d'élevage. C'est le constituant le plus variable du lait, constituée d'un mélange de lipides simple (98,5 %) qui se trouvent en suspension dans le lait sous forme de minuscules gouttelettes (globules gras) et forme une émulsion. La concentration en lipides varie de 10 à 500 g/l suivant les espèces. Elles sont constituées essentiellement (98,5 %) de triglycérides. Dans un lait au repos, cette matière grasse s'agglutine à la surface, formant la crème. Dans la famille des lipides simple, on trouve dans le lait environ 95-96% de triglycérides, 2-3% de diglycérides et 0,1% de monoglycérides (**Afnor, 2001**).

- Les protéines comportent deux groupes :

- La caséine, le mot vient du latin *caseus*, « fromage ». La caséine est différemment concentrée selon les laits : 82 % (du total des protéines) pour le lait de vache et 40 % (du total des protéines) pour le lait humain. L'hydrolyse d'une caséine fait ressortir des teneurs élevées en glutamique, proline, leucine, lysine, sérine et thréonine (**George et Burdock, 1997**).
- Les micelles protéiques, ont un diamètre de l'ordre de 0,1 µm. Les séroprotéines se trouvent dans le lactosérum (**Smiddy et al., 2006**).

Le lactose est présent en solution dans le lait, c'est généralement le principal élément solide du lait. Son pouvoir sucrant est six fois plus faible que celui du saccharose. Il peut provoquer certaines intolérances (**Ping Kang et al., 2008**).

Les composants secondaires du lait sont constitués par les sels, les enzymes, les vitamines et les oligo-éléments. Sa richesse en calcium et en phosphore font du lait un aliment très adapté à la croissance des jeunes enfants. Le phosphore y est fixé sous forme de phosphates. Le calcium s'associe au phosphate et à la caséine pour donner le complexe phosphocaseinate de calcium et forme un colloïde.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du lait (Akli, 2011).

Densité du lait à 20°C	1,028-1,034
Densité de lait écrémé	1,035-1,036
Densité de la matière grasse	0,92-0,94
Point de congélation	0,530-0,555
PH à 20°C	6,6-6,8
Acidité titrable	14-17 °D
Activité de l'eau à 20°C	0,9

On y trouve également du magnésium, du potassium et du sodium mais il est, du moins pour le lait de vache, pauvre en oligoéléments (**Alais et Linden. 1987**).

Les vitamines apportées sont surtout les vitamines B2 et B12 (hydrosolubles) ainsi que les vitamines A et D (liposolubles).

Le lait, est parmi les liquides biologiques animaux, un de ceux qui contiennent la plus grande concentration **d'acide citrique**, c'est un anticoagulant et il s'oppose à la précipitation des protéines. Globalement, il y a plus de groupes carboxyle que de groupes amines, ceci explique que le lait soit légèrement acide (**Evershed et al.,2008**).

3- propriétés physico-chimiques du lait

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite ou de l'allaitement. La connaissance des propriétés physicochimiques du lait revêt une importance incontestable car elle permet de mieux évaluer la qualité de la matière première et de prévoir les traitements et opérations technologiques adaptés (**Alais et Linden. 1987**) (**Tableau 1**).

4- Valeur alimentaire

Le lait est un aliment liquide, mais sa teneur en matière sèche (10 à 13%) est proche de celle de nombreux aliments solides. Le caractère essentiel de sa composition est son harmonie qui a fait de lui un aliment de valeur nutritionnelle inestimable, particulièrement pour l'enfant. La plupart des éléments nécessaires à l'édification des tissus de l'organisme sont en effet présent (**Derby, 2001**).

Les protéines du lait ont une valeur nutritive élevée, en particulier la lactoglobuline et la lactalbumine, riche en acides amines soufrés. Le lait représente également une excellente source de calcium, de phosphore, de riboflavine et relativement riche en thiamine, Vitamine A.

Valeur nutritive	
par 125 mL (87 g)	
Teneur	% valeur quotidienne
Calories 80	
Lipides 0,5 g	1 %
saturés 0 g	0 %
+ trans 0 g	
Cholestérol 0 mg	
Sodium 0 mg	0 %
Glucides 18 g	6 %
Fibres 2 g	8 %
Sucres 2 g	
Protéines 3 g	
Vitamin A 2 %	Vitamin C 10 %
Calcium 0 %	Fer 2 %

Fig 2. Valeur nutritive du lait.

Cependant il est pauvre en fer, cuivre, acide ascorbique et en vitamine D (**Fig.2**).

- Le lait possède une valeur énergétique de 700 kcal/litre
- La haute qualité nutritionnelle des protéines du lait repose sur leur forte digestibilité et leurs compositions particulièrement bien équilibrée en acides aminés indispensables.
- Pour les nouveau-nés, les protéines du lait constituent une source protéique adaptée aux besoins de croissance durant la période néonatal (**Derby, 2001**).

5- Microbiologie du lait

Le lait est également un milieu biologique : il contient des cellules sanguines et mammaires (autour de 250000 par ml) et des micro-organismes (autour de 15000 par ml) (**Gonfa, 2001**). Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. De ce fait on trouve que le lait comporte une flore originelle et une flore de contamination (**Gonfa, 2001**).

5.1- Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques, lactobacilles. Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Streptocoque pyogène*, *carynebactéries pyogènes*, des staphylocoques) qui sont des agents des mammites et peut s'agir aussi de germes d'infection générale *Salmonella sp.*, *Brucella sp.*, et exceptionnellement *listeria monocytogene*, *mycobactérie*, *Bacillus anthracis* et quelque virus (**Guiraud, 2003**).

5.2- Flore de contamination

Le lait peut se contaminer par des apports microbiens divers:

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques, *Clostridium sp.*, *Salmonella sp.*
- Sol: *Streptomyces sp.*, *Listeria sp.*, bactéries sporulés, spores fongiques.

- L'air et l'eau : Flores diverses, bactéries sporulés (**Guiraud, 2003**).

6- Différents types de laits

Suivant les espèces animales et les races au sein d'une même espèce ; elle varie également chez une même laitière en fonction de la période de la lactation et de l'alimentation (**Vilain, 2010**).

De nos jours, de nombreux produits sont fabriqués de manière industrielle à partir du lait. Cependant, l'industrialisation concerne principalement le lait de vache, et à plus petite échelle, le lait de brebis, de chèvre et de chamelle (**Vilain, 2010**).

6.1- Lait de vache

Le lait de vache est le lait produit par la vache pour alimenter son veau. il contient les trois nutriments principaux (glucides, lipides, protéines), des sels minéraux comme le calcium et le phosphore, des vitamines, ainsi que l'hormone de croissance du veau.

Le lait ne contient qu'un seul type de glucide, le lactose, susceptible de se dégrader en acide lactique. Le lactose est entièrement dissous dans le lait (**Chaumont, 2005**).

Les matières grasses du lait de vache sont composées à 98 % de triglycérides.

Les protéines du lait de vache sont composées à 80 % de caséine, une protéine susceptible de coaguler en milieu acide ou sous l'action de la présure et il est riche en Calcium, en Phosphore et des vitamines A, D, E, K, B2, B12 (**Chaumont, 2005**).

6.2- Lait de brebis et de chèvre

***Le lait de brebis :** est nettement plus riche que le lait de vache et le lait de chèvre. Sa teneur en matière sèche est de l'ordre de 190g/l contre seulement 130 g/l pour le lait de vache. En moyenne, le lait de brebis renferme 70 à 75 g/l de matière grasse contre 40 g/l pour le lait de vache (**Vilain, 2010**).

La teneur en matières azotées est en moyenne de 55 à 60 g/l. La teneur en sels minéraux (10 à 12 g/l) est également supérieure à celle du lait de vache (8 à 10g/l).

***Le lait de chèvre :** à une composition assez voisine de celle du lait de vache. Le lait de chèvre ne contient pas de bêta-carotène, c'est pourquoi il a une couleur blanche que l'on retrouve dans les fromages (**Vilain, 2010**).

Les laits de brebis et de chèvre diffèrent l'un et l'autre du lait de vache, mais présentent aussi entre eux des différences notables concernant certains critères. Ils sont de plus en plus appréciés, non seulement sous forme de fromage, mais aussi sous celles de lait de consommation et de yogourt (**Vilain, 2010**).

Le lait de brebis contient nettement plus de matière grasse et de protéines que les deux autres laits, et donc davantage de vitamines liposolubles (A et E). Il présente aussi une teneur relativement élevée en calcium (**Vilain, 2010**).

Ces différents types de lait (de vache, de chèvre et de brebis) sont également des milieux biologiques : ils contiennent des cellules sanguines et mammaires (autour de 250 000 par ml) et des micro-organismes (autour de 15 000 par ml).

6.3- Lait de chamelle

a- Définition

Le lait de chamelle est un pur nectar. Légèrement plus salé que le lait de vache, il est très bon pour la santé. Après tout, la nature l'a conçu pour aider les bébés chameaux à grandir dans certains des plus rudes environnements du globe, les déserts et les steppes. Ce qui explique pourquoi il est trois fois plus riche en vitamine C que le lait de vache (**FAO, 2006**).

En Algérie, le lait de chamelle est un produit du terroir très prisé dans les régions sahariennes. Il connaît actuellement un grand engouement à cause de ses vertus en tant que produit sain ami de la santé.

En règle générale, le lait de chamelle ne se vend pas. Il est consommé par l'éleveur et sa famille. Les chercheurs algériens sont formels, les potentialités sont grandes et méritent un intérêt particulier des pouvoirs publics afin d'accompagner le développement des systèmes d'élevage camelin vers l'intégration dans des logiques marchandes en matière de

Tableau 2 : Teneurs moyennes des différents lait (www.fromagium.fr).

	EAU	SUCRES	MG	PROTEINES	MINERAUX
VACHE	860-880	47-50	35-45	30-36	8-10
BREBIS	800-835	44-48	60-80	50-65	10
CHEVRE	870-895	42-48	30-34	27-37	8
BUFFLONNE	820-835	48-50	70-74	38-44	8-10
CHAMELLE	903	32	32	27	6
JUMENT	890-900	62	15-20	19-26	4
RENNE	630-700	25-50	160-200	100	15-20
FEMME	880	70	36	10-12	3

production laitière. Il y va de la sécurité alimentaire du pays classé comme zone aride du fait de ses 80% de territoire steppique et saharien et dont une frange de la population, justement celle habitant les zones camelines potentielles se nourrit principalement du lait en poudre reconstitué alors que la valorisation d'espèces rustiques comme le dromadaire et la chèvre peuvent contribuer à la sécurité alimentaire des populations d'autant plus que l'état des connaissances sur le produit «lait de chamelle» et sur les systèmes de production cameline est en évolution de part le monde (**Alioua, 2011**).

Le lait de chamelle est un aliment spécifique par son aspect, sa composition et son comportement vis-à-vis aux changements des conditions du milieu. En fait, le lait de chamelle à l'état frais est plus acide et moins dense que le lait bovin (**Tableau 2**).

b- Comparaison entre le lait de vache et le lait de chamelle

La composition chimique de lait de chamelle est caractérisée par sa teneur importante en matière protéique ainsi qu'en vitamines C et B, toutefois ces concentrations varient selon l'alimentation, le stade de lactation ainsi qu'aux conditions environnementales. Sa composition en éléments minéraux paraît plus riche que le lait de vache surtout en Calcium et Potassium. La période de conservation du lait chamelle est fonction de la température du milieu, mais toujours plus longue que celle du lait de vache, elle est de plus que 24 heures à température ambiante, 7 jours à 4°C et plusieurs semaines sous congélation. Comme l'utilisait les nomades ou les habitants des milieux arides, le lait de chamelle présente une grande valeur nutritive à l'état frais.

Néanmoins cette valeur nutritive et composition particulière peuvent se maintenir presque intactes par congélation, cette méthode peut satisfaire à l'un des soucis de l'homme qui tente à trouver des procédés de conservation de ce lait pour différer dans le temps de sa consommation, pour ne pas le limiter aux habitants des milieux arides (**Sbouï et al.,2009**).

c- Microbiologie du lait de chamelle

Le lait est un substrat renfermant des concentrations satisfaisantes en protéines, en glucides, en lipides, en sels minéraux et en vitamines, pour la croissance cellulaire. Les microorganismes existant dans notre environnement, vont donc trouver dans ce bioproduit un substrat idéal pour leur développement. La présence de nombreux facteurs de croissance permet de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans un milieu moins complet (**Larpent et al.,1997**). Le lait contient peu de microorganismes (3000 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions et à partir d'un animal sain (**Guiraud, 1998**). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et bacilles.

D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade, par exemple l'espèce *Staphylococcus aureus* issus d'un animal atteint de mammites. Ainsi, au cours de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine, le lait peut être contaminé par une grande variété de micro-organismes. Une partie seulement d'entre elles peut se multiplier dans ce bioproduit si la température est favorable et le milieu est propice (**Laprent et al.,1997**).

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

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

7 - Les produits laitiers

Les produits laitiers sont au cœur de notre alimentation, sous des formes variées et riches en goût. Lait, fromage, yaourt, beurre, crème et desserts lactés font ainsi partie de notre quotidien.

a- Le lait fermenté : est un produit laitier obtenu par la fermentation du lait, lequel peut avoir été fabriqué à base de produits obtenus à partir de lait avec ou sans modification de composition, dans la limitation des dispositions de la section 3.3, par l'action de micro-organismes appropriés et résultant dans la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique). Ces levains (micro-organismes) doivent être viables, actifs et abondants dans le produit à la date de durabilité minimale. Si le produit subit un traitement thermique après la fermentation, l'exigence portant sur la viabilité des micro-organismes ne s'applique plus (**FAO et OMS. 2003**).

Au pays du Maghreb, la fermentation du lait donne le «Lben ». Sa préparation, très simple, est demeurée au stade familial ou artisanal ; le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h suivant la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 min. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre ; produit dégrade valeur marchande (**Benkerroum et Tamime. 2004**).

b- Le beurre : est un aliment excellent pour la santé. On en consomme depuis plus de 3000 ans! Le goût du beurre de ferme diffère de celui du beurre de laiterie. En effet, à la laiterie, on utilise du lait pasteurisé alors qu'à la ferme on prend du lait cru non réchauffer. Par ailleurs, à la laiterie, on mélange des laits de différentes fermes. Or, le goût du lait dépend de ce que la vache a mangé. Le goût du beurre de ferme peut donc changer d'une saison à l'autre selon que la vache broute dans les prés ou est nourrie à l'étable... (**FAO et OMS. 2003**).



Fig 3. Beurre.



Fig 4. Fromage.



Fig 5. Yaourt.

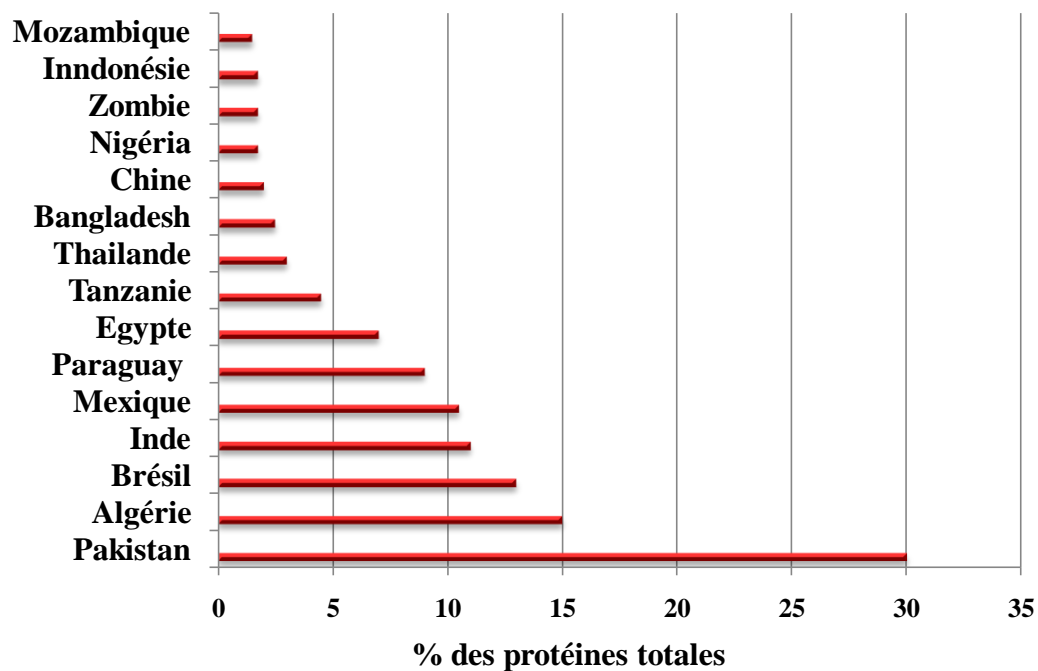


Fig 6 .Part du lait dans la consommation totale de protéine dans certains pays. (FAO, 2006).

Le principal atout du beurre de laiterie non salé, c'est qu'il se conserve aisément 2 mois au réfrigérateur. Plus de six mois s'il est surgelé (**FAO et OMS. 2003**) (**Fig.3**).

c- Le lait battu : est la partie non grasse de la crème obtenue par le barattage de celle-ci lors de la fabrication du beurre. Le lait battu est excellent sur le plan diététique (**FAO et OMS. 2003**).

d- Le fromage : est un aliment intéressant sur le plan nutritionnel: il est riche en protéines, en calcium et en vitamines B, A, D, E et K. De plus, il ne pose généralement pas de problèmes aux personnes qui digèrent mal le lactose du lait.

Il existe bien des variétés de fromages: à pâte fraîche ou à pâte molle. Les fromages à pâte molle peuvent être à croûte fleurie (une fin duvet blanc recouvre leur surface) ou à croûte lavée. Il existe aussi des fromages à pâtes persillée ou des fromages bleus. Mentionnons encore les fromages à pâte pressée (**FAO et OMS. 2003**) (**Fig.4**).

e- Le yaourt (ou yoghourt) : est un produit laitier fermenté. C'est un aliment très sain et excellent pour les intestins. On conseille d'en consommer chaque jour, non seulement pour le calcium qu'il contient, mais aussi pour son action bénéfique sur la flore intestinale (**FAO et OMS. 2003**) (**Fig.5**).

8- Consommation du lait

La consommation de lait et de produits laitiers ne serait-elle qu'une habitude alimentaire récente et occidentale promue par le marketing de l'industrie laitière ; C'est ce que d'aucun tentent aujourd'hui de faire croire. La richesse du colloque « Cultures des laits du monde ». À travers le monde, les travaux des chercheurs montrent que la consommation de lait est ancienne, qu'elle est souvent primordiale pour les populations, qu'elle est intimement liée aux cultures, voire au sacré (**Amellal, 1995**).

L'Algérie est classée aux premiers rangs dans la rive méditerranéenne en termes de consommation de lait (**Fig.6**). Son niveau de consommation annuel est estimé à 1,5 milliard de litres entre laits cru collecté et poudre de lait transformé (**Ould Hamouda, 2012**).

La production laitière moyenne annuelle au cours de la dernière décennie est environ de 1 milliard de litres dont 60 % provient de l'élevage bovin, 26 % de lait de brebis et 13 % de lait de chèvre. La production laitière cameline n'est pas prise en compte (**Ould Hamouda, 2012**).

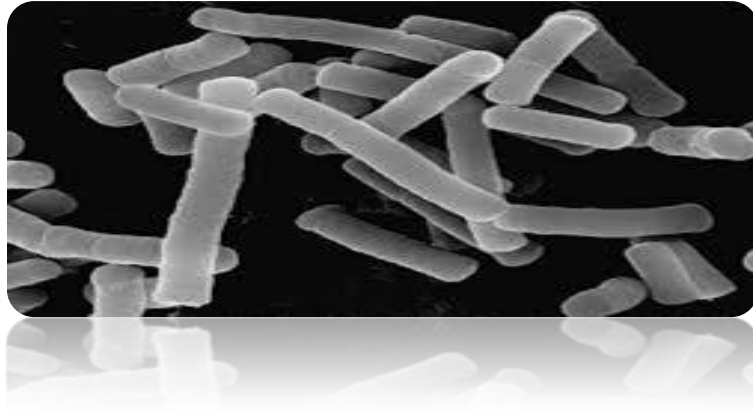


Fig 7. *Lactobacillus Rosell-11* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000).

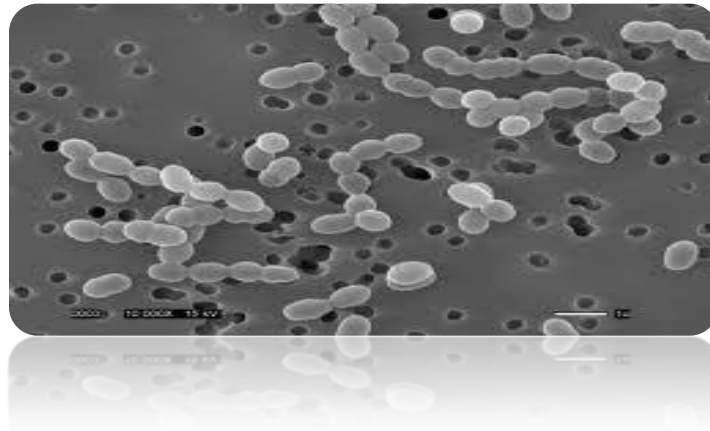


Fig 8. *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000).

1-Présentation des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Ces bactéries peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques (**Fig.7, Fig.8**), sont immobiles et non sporulantes. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) (**Leveau et Boui. 1993**). Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al.,1994**).

2- Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent-en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Klein et al.,1998**).

2.1- Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (**Hammes et Hertel. 2006**). Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (**MRS**) (**Annexe 2**). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween80. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.

2.2- Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments « starter culture » par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Gálvez et al.,2011) acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (*Li. monocytogenes*). Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (Gálvez et al.,2011).

2.3- Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérosécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonas vaginale (Björkroth et Holzapfel. 2006) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (Falagas et al.,2006).

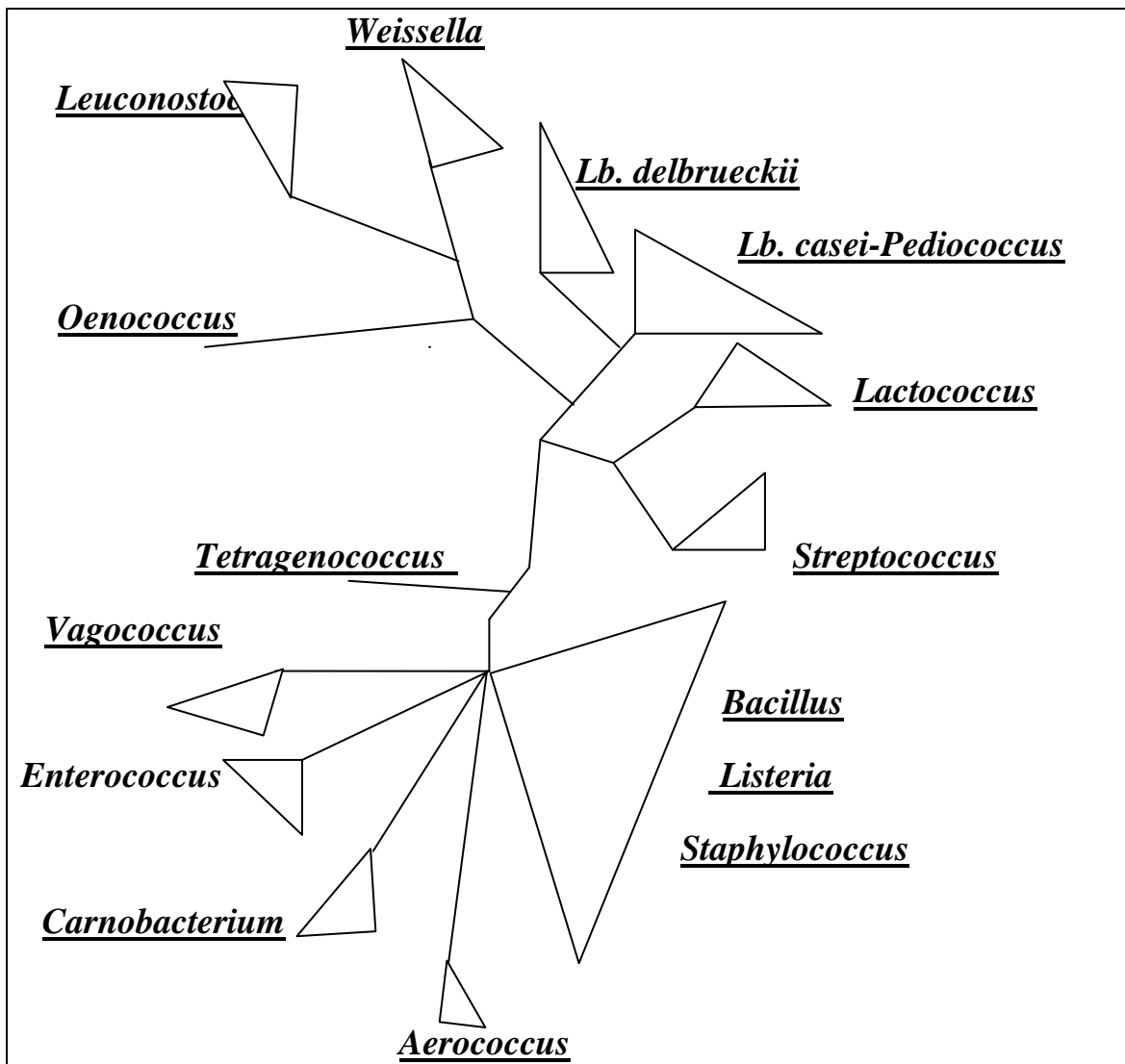


Fig 9. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres

Aerococcus, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus*.

(Axelsson *et al.*,2004).

3-Diversité et taxonomie

3.1- Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries. D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lb. lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (Duwat *et al.*,2001).

3.2- Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens tels que :

Bifidobacterium, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*,... (Fig.9).

De plus, l'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une évolution taxonomique (Vandamme *et al.*,1996). Parmi les bactéries lactiques, *Lactobacillus* présente le genre le plus répandu. Ce dernier comprend à lui seul de nombreuses espèces qui diffèrent par leurs caractéristiques phénotypiques, biochimiques et génétiques. Parmi les bactéries lactiques, *Lactobacillus* présente le genre le plus répandu. Ce dernier comprend à lui seul de nombreuses espèces qui diffèrent par leurs caractéristiques phénotypiques, biochimiques et génétiques (Vandamme *et al.*,1996).

3.3- Taxonomie des bactéries lactiques

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (**Ambrosini et al.,1996**), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique et les acides gras insaturés qui la composent (**Gilarová et al.,1994**).

Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes :

Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.

Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.

Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales (**Mcleod et al.,2008**).

Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Mäkelä et al.,1992**).

Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques: groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei- Pediococcus* (**Rodrigues et al.,1991**).

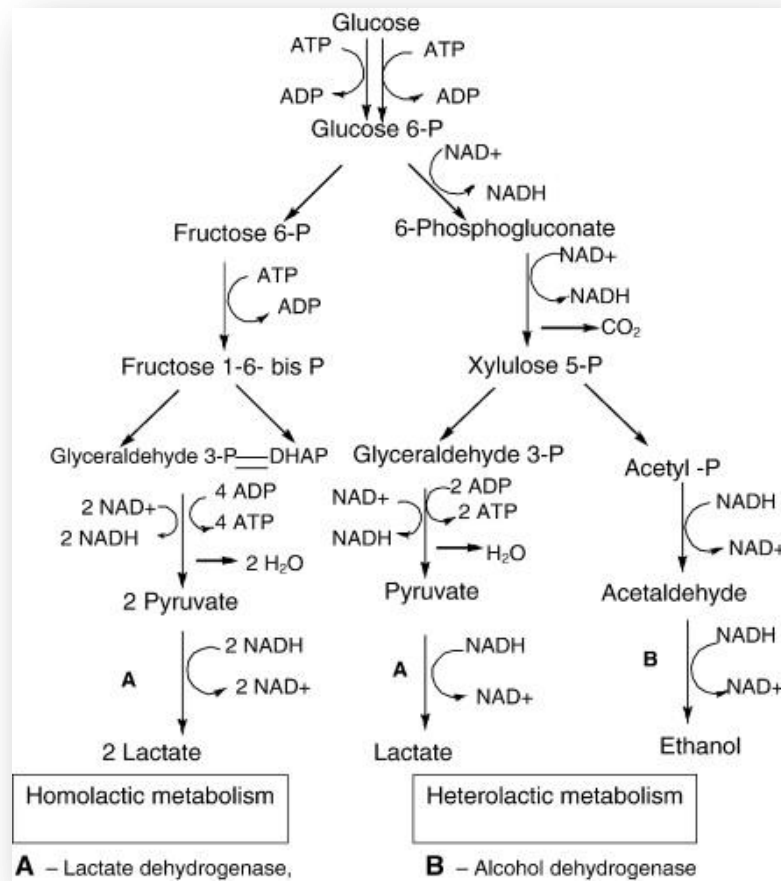


Fig 10. Voies fermentaires de la dégradation du glucose.

(Atlan *et al.*,2008).

4- Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose).

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan *et al.*,2008) :

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (fig .10). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*,2008).

4.1- Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks. 1994).

4.2- Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétéro fermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *leuconostoc*



Fig 11. Produits laitiers commercialisés fabriqués à partir de bactéries considérées comme probiotiques.

et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

5- Rôle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques qui ont en commun la capacité de produire de l'acide lactique.

Elles sont utilisées depuis des millénaires dans la fabrication d'aliments fermentés, et en particulier dans celle de certains produits laitiers (yaourt, fromage, beurre, babeurre, etc.). Elles permettent la conservation du lait, et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment originel (**Luquet et al.,2008**).

Des travaux de plus en plus nombreux étudient les « effets santé » de différentes souches de bactéries lactiques et essaient de cerner leur mécanisme d'action dans le tractus digestif. Si les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés, certains, comme le traitement des désordres diarrhéiques par exemple sont bien documentés pour certaines souches mais d'autres demandent encore confirmation. De plus, il faut toujours avoir à l'esprit que ce qui est démontré pour une espèce et une souche donnée n'est pas transposable à une autre (**Luquet et al.,2008**).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou « probiotique » (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) (**fig.11**) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al.,2002**).

Parmi les effets bénéfiques des bactéries lactiques : le retard du rassissement des produits, l'augmentation de l'acidité, la protection contre autres bactéries pathogènes et plusieurs microorganismes, l'abaissement de l'index glycémique et l'amélioration des flaveur et de la texture due la sécrétion de molécules aromatiques et à leur activités enzymatiques (**Stiles, 1996**).

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes et surtout antibactériennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (**Stiles, 1996**).

1- Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Liu, 2003**).

1.1- Le pH et les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (**Liu, 2003**). Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intra cellulaires. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (**Janssen et al., 2007**).

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture. Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (**Kobilinsky et al.,2007**).

1.2- Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires. Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases.

La concentration de peroxyde d'hydrogène produite par des *Lactobacilli* varie entre 0,001 et 8 mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures (**Strus et al.,2006**). Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (**Zalan et al.,2005**).

1.3- Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor et al.,2006**).

1.4- Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (CHO) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (**El Ziney et al.,1998**). Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) (**Caplice et Fitzgerald. 1999**).

1.5- La reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (**El-Ziney et al.,1998**).

La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycerol deshydratase » pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes.

La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram positif ou Gram négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider, 2004**).

1.6- Les bactériocines

1.6.1-Définitions, généralités

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (**Klaenhammer, 1988**).

Dans ce mémoire, nous parlerons des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif et plus particulièrement celles provenant des bactéries lactiques du lait de chamelle .

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (**Heng et al.,2007**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches .Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines.

L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. (**Cotter et al.,2005**).

La biosynthèse des bactériocines implique le plus souvent des groupes de gènes ou clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription. Il existe une appellation génotypique spécifique pour chaque bactériocine, par exemple nis pour le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la nisine et mrs pour celui impliqué dans la biosynthèse de la mersacidine. Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des bactériocines sont formés de trois groupes de gènes. Un groupe renfermant un gène

de structure codant le peptide précurseur et un gène d'immunité codant une protéine d'immunité impliquée dans la protection de la souche productrice contre sa propre bactériocine. Le deuxième groupe de gènes rassemble un gène codant un transporteur ABC impliqué dans le transport de la bactériocine vers le milieu extracellulaire ainsi que chez quelques bactériocines, un gène codant une protéine accessoire impliquée dans le transport de la bactériocine, et enfin un gène codant une protéine de fonction inconnue. Le dernier groupe de gènes est impliqué dans la régulation de la biosynthèse des bactériocines et regroupe un gène codant une protéine kinase membranaire et un gène codant un activateur transcriptionnel. Le transport du peptide précurseur sollicite un transporteur ABC chez de nombreuses bactéries productrices. D'autres souches productrices utilisent le système Sec pour l'export de leur peptide précurseur (**Maqueda et al.,2008**). Une fois synthétisé, le peptide précurseur subit un clivage par une protéase spécifique chez quelques bactériocines, afin d'acquies sa forme mature qui est exportée vers le milieu extracellulaire via le transporteur ABC. La biosynthèse des bactériocines n'est pas constitutive et se trouve régulée soit par la bactériocine elle-même qui joue le rôle de phéromone soit par une phéromone spécifique (**Dişu et al.,2009**).

Une fois dans le milieu extracellulaire, la bactériocine interagit avec la membrane plasmique de la bactérie cible via des interactions électrostatiques. L'effet antimicrobien se traduit généralement par la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible. Différents mécanismes d'action sont connus, le plus courant consiste en une perméabilisation de la membrane de la bactérie cible. Ce phénomène se traduit par la formation de pores transitoires ou permanents provoquant la dissipation d'ATP, d'ions K⁺, Na⁺,... et la mort de la bactérie cible (**Nissen et al.,2010**).

La bactériocine peut également interagir soit directement avec la membrane plasmique ou bien via un récepteur membranaire

D'autres effets antimicrobiens moins fréquents sont également rencontrés comme l'inhibition de la synthèse d'acides nucléique et de la synthèse de la paroi bactérienne, comme c'est le cas de la mersacidine (**Brogden, 2005**).

1.6.2- Classification

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export et leur mécanisme d'action. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile et plusieurs classifications ont été successivement proposées. Se basant sur la structure primaire, le mode d'action et la structure tridimensionnelle (**Klaenhammer, 1993**) ont proposé deux classes principales de bactériocines, la **classe I** regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement, les lantibiotiques et **la classe II** renfermant les bactériocines non modifiées et thermo-résistantes appelées « pediocin-like ». Ces deux classes ont été par la suite subdivisées en sous-classes. Se rajoute à ces deux classes une troisième classe **la classe III** qui renferme les bactériolysines, des protéines thermosensibles pourvues d'activité enzymatique ainsi qu'une dernière classe **la classe IV** regroupant des complexes protéiques liés à une partie lipidique ou glucidique (**Heng et al.,2007**). Cette dernière classe n'étant pas clairement caractérisée, de nombreux auteurs ont préféré l'écarter de la classification. Considérant la classe IV comme inappropriée, Diep et Nes ont proposé une classification des bactériocines en accord avec celle de Klaenhammer, mais sans la classe IV. Ensuite, différents auteurs ont proposé une nouvelle classe IV, composée des bactériocines circulaires et dans le même temps, soit l'abandon de la classe III, soit son maintien dans la classification (**Diep et Nes, 2002**).

Parallèlement, Cotter et al, ont proposé une classification regroupant les bactériocines en deux groupes principaux. **La classe I**, ou lantibiotiques, est subdivisée en plusieurs groupes en fonction de leur structure primaire tandis que **la classe II** est subdivisée en quatre sous-groupes : les classes IIa des « pediocin-like », IIb des « two-peptides », IIc des bactériocines circulaires et IId des bactériocines non modifiées et non « pediocin-like ». Pourvues d'activité enzymatique, les bactériocines de **classes III** sont plutôt considérées comme des enzymes que comme des peptides antimicrobiens et sont par conséquent écartées de la classification .

En fait, seules les classes I et II sont communément admises par la plupart des auteurs. Cependant on peut remarquer que les bactériocines circulaires peuvent constituer soit **la classe IV** soit la classe IIc , selon les auteurs (**Cotter et al.,2005**).

Récemment, une nouvelle classification a été proposée par Zouhir et al. Elle est basée uniquement sur la structure primaire et propose 12 groupes distincts de bactériocines (**Zouhir et al.,2010**).

Dans notre étude, nous nous baserons sur le modèle de classification de Paul Cotter, qui propose deux classes principales de bactériocines : **la classe I** appelée la classe des lantibiotiques regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement et **la classe II** qui regroupe les bactériocines non modifiées.

Les sous-divisions de chaque classe de bactériocines seront développées plus loin (**Cotter et al.,2005**).

a- Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et subissant des modifications post-traductionnelles importantes.

Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (**Cotter et al.,2005**).

Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est le plus souvent, présent sous forme de groupes de gènes (clusters). Ces clusters ont été largement étudiés ces dernières années (**Bierbaum et Sahl. 2009**).

Les lantibiotiques ont été classés en fonction de leur structure par Günther Jung (**Jung, 1991**) en deux types principaux : le type A (ex. nisine) et le type B (ex. mersacidine).

Le type A regroupe les lantibiotiques linéaires chargés positivement (**Twomey et al.,2002**). Le type A est subdivisé en deux sous-groupes, A I et A II, en fonction de leur structure.

Les lantibiotiques du groupe A I (nisine, subtiline, épidermine) possèdent uniquement une structure linéaire. Le groupe A II (nukacine ISK-1, mutacine II, lacticine 481) regroupe les lantibiotiques formés d'une région N-terminale linéaire et d'une région C-terminale globulaire (Nagao *et al.*,2006) (Fig. 12).

Les lantibiotiques de **type B** (Fig. 12) ont une structure globulaire (Twomey *et al.*,2002).

Un troisième groupe renferme les lantibiotiques « two-peptides » formés de deux peptides agissant en synergie. Ce groupe renferme des lantibiotiques comme la lacticine 3147 (Fig. 12) , la staphylococcine C55 et l'haloduracine. De nombreux nouveaux lantibiotiques ont plus récemment été découverts comme la nisine Q, la streptine, la bovisine et la thermophiline 1277 qui est avec la sublancine 168 un lantibiotique possédant un pont disulfure (Kabuki *et al.*,2009).

➤ Biosynthèse

Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont organisés en clusters dont le locus est symbolisé par lan . Le système génétique impliqué dans la production des lantibiotiques est retrouvé sur le chromosome (subtiline), sur un plasmide (nukacine) ou sur des éléments transposables présents sur le chromosome (nisine).

Le système génétique codant la nisine est le plus étudié et le mieux connu .Il est symbolisé par nis. Pour les lantibiotiques, le gène lanA (nisA pour la nisine) code le peptide immature ou peptide précurseur composé de 23 à 59 acides aminés (57 acides aminés pour la nisine). Le peptide précurseur est inactif et serait impliqué dans la protection de la souche productrice, mais son rôle précis demeure mal connu (Lubelski *et al.*, 2008).

➤ Régulation de la biosynthèse chez les lantibiotiques

La production des lantibiotiques est régulée au niveau transcriptionnel en fonction de la quantité de lantibiotique présent dans le milieu. Les deux modèles de régulation les plus étudiés sont retrouvés chez la nisine et la subtiline produites respectivement par *Lc. lactis* et *B. subtilis* (Engelke *et al.*,1994).

Le quorum sensing est un système d'autorégulation dans lequel les lantibiotiques jouent le rôle de phéromones pour leur propre production. Lorsqu'il est présent en quantité suffisante dans le milieu extracellulaire, le lantibiotique induit sa propre transcription (**Kuipers et al.,1995**).

La régulation de l'expression des gènes chez les bactéries est basée sur le niveau de transcription et plus précisément sur la capacité de fixation de l'ARN polymérase aux sites promoteurs. L'ARN polymérase est une holoenzyme composée d'un « cœur » contenant trois sous-unités et d'une protéine supplémentaire appelée facteur σ . Découvert pour la première fois chez *B. subtilis*, le facteur σ permet la reconnaissance des sites promoteurs par l'holoenzyme, initiant ainsi la transcription. Il existe plusieurs familles de facteurs σ ($\sigma 70$, $\sigma 54$, $\sigma 32$,...) chez les bactéries qui, en fonction des conditions environnementales, reconnaissent des séquences différentes spécifiques à chaque promoteur de gènes. Il a été montré que la production de la subtiline par *B. subtilis*, en fin de phase stationnaire, est associée au facteur σH (**Haldenwang, 1995**).

➤ Mode d'action

Les lantibiotiques ont principalement la membrane cytoplasmique pour cible. Pour les lantibiotiques, l'effet antimicrobien est le résultat à la fois de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne ou de l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Chatterjee et al.,2005**).

Les bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium* et *Serratia marcescens* sont résistantes aux lantibiotiques et en particulier à la nisine. Cette résistance a été attribuée à la membrane externe qui empêche les bactériocines d'accéder pentapeptide du lipide II présent dans la membrane cytoplasmique (**Chung et al.,1989**).

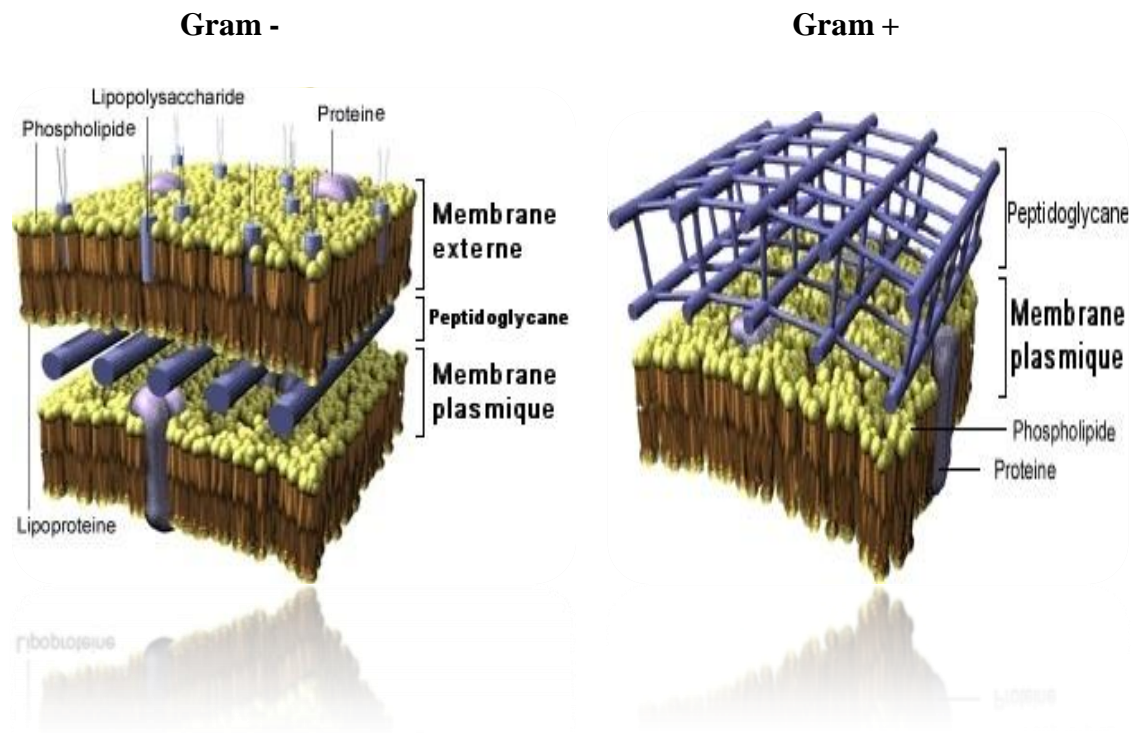


Fig 13. L'enveloppe des bactéries à Gram négatif à et Gram positif.

L'enveloppe des bactéries à Gram positif est composée d'une paroi, en contact direct avec le milieu extérieur, formée de peptidoglycanes (ou muréine), d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique. Contrairement aux bactéries à Gram positif, le peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif est plus fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques : la membrane externe (**Fig. 13**).

* Le double mécanisme d'action : La perméabilisation de la membrane cytoplasmique par formation de pores conduit à la mort de la bactérie cible après dissipation d'ions intracellulaires. L'exemple de mécanisme d'action le mieux connu est celui de la nisine et de différents lantibiotiques de type A I (subtiline et épidermine) et de type A II (lacticine 481, nukacine ISK-1).

Un premier contact est initié entre la nisine et la membrane cytoplasmique de la bactérie *Ciblevia* des interactions électrostatiques. Chargée positivement, la région C-terminale de la nisine interagit avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible fortement anionique. Les boucles formant la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine situées au niveau de la région N-terminale interagissent avec le disaccharide-pyrophosphate du lipide II, précurseur de la biosynthèse de la paroi bactérienne (**Asaduzzaman et al.,2006**).

Il existe des mécanismes d'action engendrant la formation de pores transmembranaires, le modèle 'barrel-stave' et le modèle 'wedge'.

Dans le premier modèle, les monomères de nisine, cationiques interagissent avec la membrane cytoplasmique via des interactions électrostatiques. Se positionnant perpendiculairement à la membrane bactérienne, les monomères s'agrègent et forment ainsi des pores. Cependant ces pores sont instables et transitoires en raison de forces hydrophobes qui, via des réarrangements, reconduisent les lipides membranaires à leur position initiale.

Dans le modèle 'wedge', la nisine adopte une position initiale parallèle à la membrane plasmique. L'interaction de la nisine avec le lipide II via des liaisons hydrogène aboutit à la formation d'un complexe nisine-lipide II. Respectant la surface membranaire, le lipide II fait passer l'orientation de la nisine de parallèle à perpendiculaire à la membrane

plasmique (Van Heusden *et al.*,2002). Contrairement aux lantibiotiques de type A, les lantibiotiques de type B perturbent des réactions enzymatiques impliquées dans la croissance de la bactérie cible, compromettant ainsi sa survie . Ainsi, la mersacidine agit en se liant au lipide II et en inhibant la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne (Brötz *et al.*,1998).

b- Les bactériocines de classes II

La classe II forme un groupe relativement hétérogène de peptides de masses moléculaires < 10 kDa. Contrairement aux lantibiotiques, les bactériocines de classe II ne présentent pas de modifications post-traductionnelles. La classe II peut être subdivisée en quatre sous-classes IIa à IId qui seront décrites ci-après.

La classe IIa : Les bactériocines de classe IIa sont aussi communément appelées bactériocines « pediocin-like » en référence à la pédiocine, une des premières bactériocines de la classe IIa caractérisées. Ces bactériocines sont produites, pour la plupart, par des bactéries lactiques et représentent le groupe de bactériocines de classe IIa le mieux étudié . Les bactériocines de classe IIa ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur production par des bactéries isolées de l'alimentation et ce combiné à une activité antimicrobienne dirigée contre des pathogènes majeurs responsables d'infections, tels que *Li. monocytogenes*. De façon générale, les bactériocine « pediocin-like » présentent un spectre d'activité étroit limité aux bactéries à Gram positif. Depuis la découverte de nombreuses bactériocines pendant les années 90, telles que la curvacine A ,sakacine A , la leucocine A , la mésentéricine Y105 , la pédiocine PA-1 et la sakacine P , de nombreuses nouvelles bactériocines ont été découvertes , comme la mundticine L et l'avicine A (Birri *et al.*,2010).

Les bactériocines de classe IIa sont des peptides antimicrobiens cationiques et partiellement amphipathiques et/ ou hydrophobes de masse moléculaire inférieure à 5500 Da. Elles sont constituées de 37 à 49 acides aminés. La structure primaire des bactériocines de classe IIa est formée d'une région N-terminale conservée portant une séquence consensus et d'une région C-terminale variable.

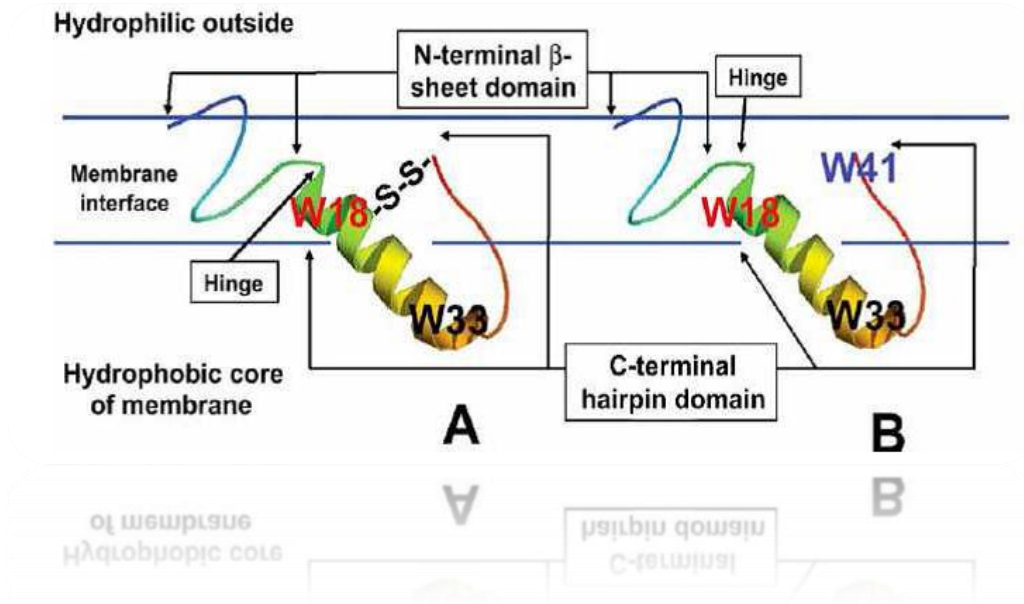


Fig 14. Schéma de la structure et l'orientation de deux bactériocines des sous groupes 1/2 et 3 dans la membrane plasmique de la bactérie cible.

(Nissen *et al.*,2009).

A : Structure des bactériocines dont la région C-terminale est stabilisée par un second pont disulfure.

B : Structure des bactériocines dont la région C-terminale est stabilisée par la présence de deux résidus Trp (W18 et W41) localisés à l'interface membrane-eau.

L'hétérogénéité de la région C-terminale a permis à Nissen-Meyer et coll de subdiviser les bactériocines de classe IIa en 4 sous-groupes présentés dans la (**Fig. 14**). D'autres caractéristiques communes aux bactériocines de classe IIa sont la résistance aux hautes températures et l'effet antimicrobien associé à la présence d'au moins un pont disulfure (**Nissen et al.,2009**).

▪ Biosynthèse et régulation

Le schéma commun d'organisation des systèmes génétiques impliqués dans la biosynthèse, le transport et la régulation de la biosynthèse des bactériocines de classe IIa est constitué de trois groupes de gènes. Un groupe impliqué dans la biosynthèse et l'immunité à la bactériocine renferme les gènes codant le précurseur de la bactériocine (B) et la protéine d'immunité (I). Un groupe impliqué dans l'export de la bactériocine renferme les gènes codant un transporteur ABC (D), une protéine accessoire (E) et parfois une protéine de fonction inconnue (C). Enfin, un dernier groupe impliqué dans la régulation de la production de la bactériocine renferme les gènes codant une protéine senseur histidine kinase (K) et une protéine effectrice régulatrice (R) ainsi qu'une phéromone (S).

Le système génétique est structuré en une seule unité de transcription comme pour la pédiocine PA-1, la coaguline et la plantaricine423 ou en plusieurs unités de transcriptions, chacune correspondant à un groupe de gènes comme chez la carnobactériocine B2 (**Ennahar et al.,2000**).

Souvent porté par des plasmides conjugatifs, le système génétique peut être aussi présent sur le chromosome bactérien comme c'est le cas pour la divercineV41 , l'entérocin A et la sakacine P .

Les bactériocines de classe IIa sont synthétisées sous forme d'un précurseur, le plus souvent inactif, portant une séquence signal. La séquence signal portée par le précurseur détermine la voie de sécrétion de la bactériocine. Après sa biosynthèse, le précurseur de la bactériocine est exporté par le transporteur ABC. Ce transporteur ABC présente en région N-terminale une activité protéasique qui réalise le clivage du précurseur au niveau

d'un motif Gly-Gly aboutissant ainsi à la forme active de la bactériocine (**Håvarstein et al.,1995**).

Bien que l'export via un transporteur ABC soit le plus fréquemment rencontré chez les bactériocines de classe IIa, il existe des bactériocines de cette même classe telles que la bactériocine 31, l'entéroïne P, l'entéroïne SE-K4 qui utilisent la voie générale Sec pour leur export vers le milieu extracellulaire (**Sánchez et al.,2007**).

➤ Mode d'action et immunité

a. Mode d'action : Les bactériocines de la classe IIa agissent sur les bactéries sensibles en perméabilisant la membrane cytoplasmique ce qui entraîne une dissipation de la force protomotrice et une perte de l'ATP cytoplasmique (**Herranz et al.,2001**).

Le mécanisme exact de formation de ces pores demeure néanmoins mal connu (**Diep et al.,2007**), mais il y aurait vraisemblablement une association de plusieurs molécules de bactériocines dans la bicouche membranaire . Des études utilisant des bactériocines modifiées ont montré que c'est la région C-terminale qui s'insère dans la membrane cytoplasmique. La région terminale est la région de la bactériocine qui pénètre la membrane aboutissant à la formation des pores.

b. Immunité : La majorité des bactéries productrices de bactériocines sont capable de produire des protéines d'immunité qui leur confèrent une protection contre leur propre toxine. Les protéines d'immunité sont en général spécifiques à chaque souche productrice, mais peuvent aussi dans quelques cas protéger la souche productrice contre des bactériocines phylogénétiquement proches vis-à-vis de sa propre bactériocine (**Johnsen et al.,2004**).

Vingt protéines d'immunité de vingt bactériocines de classe IIa ont été caractérisées à ce jour (**Fimland et al.,2005**).

Les protéines d'immunité des bactériocines de classe IIa sont hydrophobes et sont formées de 88 à 115 acides aminés .Les protéines d'immunité sont localisées dans le milieu intracellulaire et semblent ainsi exercer leur action du côté intracellulaire de la membrane plasmique. Bien qu'aucune étude n'ai réussi à prouver une interaction

directe entre les bactériocines de classe IIa et leur protéine d'immunité (**Sprules et al.,2004**).

1.6.3 - la production et le conditionnement des bactériocines

a- La production des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**Savijoki et al.,2006**) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée. Par exemple : la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Lors d'une optimisation de production, si différentes souches sont disponibles, le choix de la souche pourra être déterminant (**Moretro et al.,2000**).

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production .Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance.

C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *L. curvatus* LTH1174,*Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L. curvatus* L442, de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687 et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (**Nel et al.,2001**).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont



Fig 15. La nisine.

nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (**Verluyten et al.,2004**). D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (**Anastasiadou et al.,2008**). L'ajout de ces nutriments lors d'une culture Fed-batch permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en batch (**Pèrez Guerra et al.,2005**).

L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (**Pongtharangkul et Demirci. 2006**).

b- Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple : La nisine (**Fig. 15**), la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (**Parente et Ricciardi. 1999**).

1.6.4 -Application des bactériocine

a- Industrie agroalimentaire

Dans le monde s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bio-conservateurs. L'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif présentent des propriétés qui pourraient placer les bactériocines parmi les substances sans danger pour l'Homme. Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà existants (**Deegan et al.,2006**). Pour améliorer leur conservation, les aliments sont soit supplémentés en bactéries productrices, la bactériocine étant produite in situ, soit en bactériocine ex situ. Parmi elles la nisine (**Fig. 15**) est aujourd'hui la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 . La nisine est commercialisée sous une forme semi-purifiée à l'état lyophilisé (**Guinane et al.,2005**).

b- Santé

Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (**Dicks et al.,2011**). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (**Hancock, 2000**).

1.6.5 - Limites d'utilisation des bactériocines

Les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation.

Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.

La composition de l'aliment représente le premiers facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur **(Dortu et Thonart, 2009)**.

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée. D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraîne un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocines **(Schöbitz et al.,2003)**.

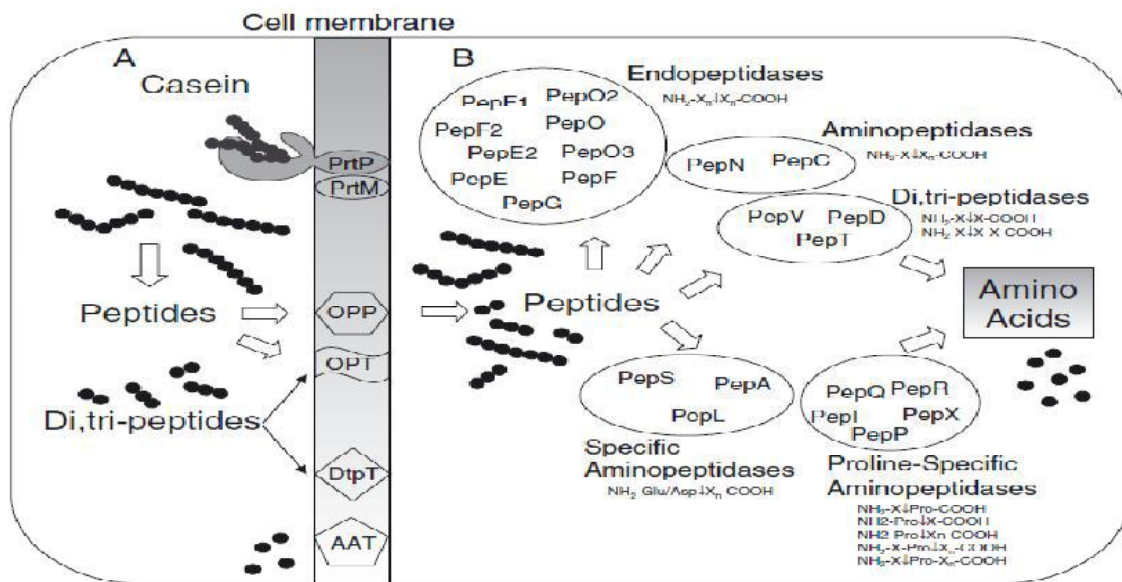


Fig 16. Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis*.

(Atlan *et al.*,2008).

B- Activité enzymatique des Bactéries lactiques

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. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**Mozzi et al.,2010**).

1- Aptitude protéolytique

De fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des bactéries lactiques repose sur leur système protéolytique. Ces systèmes comportent des protéases intracellulaires, des systèmes de transport spécifiques pour les peptides et une multitude de peptidases intracellulaires. Les systèmes protéiques des lactocoques et des lactobacilles sont remarquablement similaires, en ce qui concerne leurs composants et leurs modes d'action (**Law et Haandrikman. 1997; Savijoki et al.,2006**).

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus* et ont permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse en trois étapes (**Fig. 16**) : la première étape fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tripeptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques. Enfin, dans le cytoplasme bactérien un éventail de peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (**Atlan et al.,2008**).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (**Williams et al.,2001**).

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Monnet et al.,2008** ; **Roudj et al.,2009**).

2- Aptitude lipolytique

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif (**Fickers et al.,2008**). Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques (**DeRoissart et Luquet. 1994**) par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium* (**Brennan et al.,2002**). Cependant leur présence dans les fromages à des concentrations élevées et pendant des périodes plus ou moins importantes, peut les amener à libérer des quantités non négligeables d'acides gras libres (**Das et al.,2005**).

D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (> C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Das et al.,2005**).

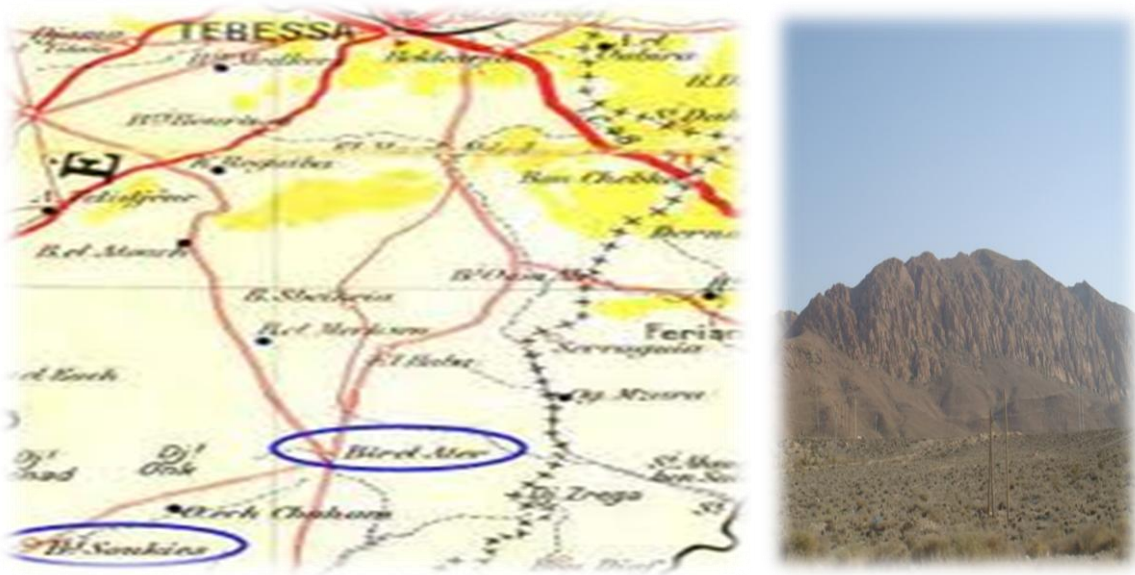


Fig 17. Carte topographique montre localisation de Soukies et Bir el Ater dans la wilaya de Tébessa.

(Bir el Ater Location Guide).

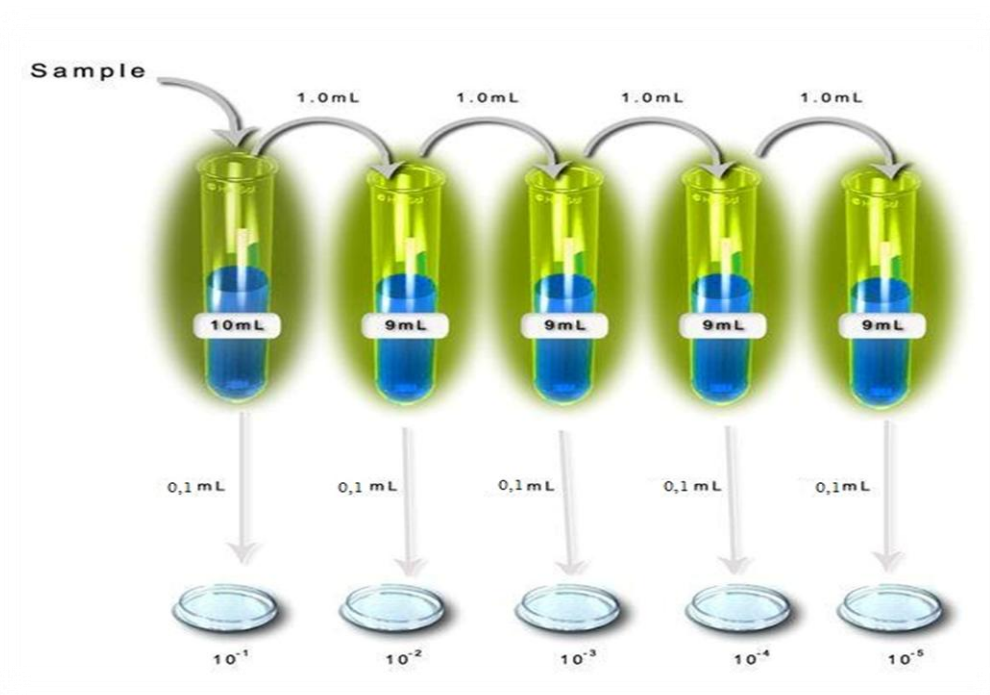


Fig 18. Méthode de dilutions décimales et isolement à partir de ces dilutions.

1-Isolement et sélection des bactéries lactiques

1.1- Origine de l'échantillon du lait à étudier

Les échantillons de lait de chamelles utilisés, proviennent de la région de Soukies « Bir el Ater » située au sud-est de l'Algérie (**Fig. 17**). Les chamelles appartiennent à la population Sahraoui. Nous avons utilisé dans cette étude trois échantillons du lait collectés le 04.05.2013 à partir de trois chamelles différentes.

Les échantillons de laits sont transportés au laboratoire de l'université dans des flacons stériles. Ils sont par la suite laissés fermenter pendant 4 jours dans une température ambiante (25-30°C).

1.2- Isolement des bactéries lactiques

Des dilutions décimales ont été préparées en prélevant et à l'aide d'une pipette 1 ml de chaque échantillon qui a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile. A partir de la solution mère, des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été effectuées pour les trois échantillons de lait fermenté (A, B, C) (**Fig. 18**).

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de Pétri, en portant 0,1 ml de chaque dilution des trois échantillons à la surface du milieu suivi d'un étalement par un râteau (**Annexe 2 et 3**). L'incubation est faite à 30°C pendant 72h en conditions d'aérobie et d'anaérobie (créer dans une boîte avec l'utilisation d'une bougie) (**Annexe 4**).

1.3- Examens macroscopiques, microscopiques et physiologiques

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur des examens macroscopiques et microscopiques et également des tests physiologiques nous permettant de confirmer leur appartenance au groupe des bactéries lactiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997), Idoui et Karam (2008) (**Gusils et al.,2010**).

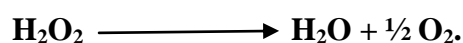
L'examen macroscopique des cultures porte sur la description de différents caractères tels que la taille, la forme, la surface et l'aspect de la surface de colonies et sa coloration avec le caractère de l'opacité (**Marchal et al.,1982**).

1.4- Coloration de Gram

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 ont été soumis à la coloration de Gram (**Annexe 5**), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (**Guiraud et Gazly. 1980**).

1.5- Test de la catalase

La catalase catalyse la réaction de dégradation de l'eau oxygénée. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est réparti: un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (**Annexe 6**) (**Guiraud, 1998**) :



2- Purification des colonies sélectionnées

Les souches à étudier sont aseptiquement repiquées sur le même milieu gélosé pour assurer sa purification, avec une incubation pendant 72h à 30°C, pour tester leurs activités antimicrobienne et enzymatique.

3- Test de l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques sélectionnées

3.1- Les souches cibles

Les souches cibles que nous avons utilisées pour le test sont : *Staphylococcus aureus* (AATTC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella sp.*

Le choix de ces cibles se fait à la base que ces dernières sont à catalase positif pour éliminer l'effet inhibiteur de peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques. Les souches sont fournies par le laboratoire de microbiologie de la clinique Mezdaouet de Khenchela.

3.2-Test du pouvoir d'inhibition des souches cibles par la production de bactériocines

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection des bactéries lactiques productrices des bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible.

La production des bactériocines est détectée par le pouvoir inhibiteur de surnageant des bactéries lactiques sur la croissance des germes cibles (**Benkarroum *et al.*,1993**).

a- Préparation de l'extrait bactériocinogénique

Nous avons cultivé des souches de bactéries lactiques à tester sur bouillon MRS pendant 24h à 30°C, afin d'obtenir des souches jeunes avec un rendement maximal en bactériocines (**Labioui *et al.*,2005 ; Doumandji *et al.*,2010**). Après incubation un volume de 3ml de bouillon est transféré dans des tubes à hémolyse stérile et centrifugé 10 minutes à 6000 tours/minutes.

b- Mise en évidence de l'activité bactériocinogénique

Les surnageants des cultures obtenus sont neutralisés avec une solution de NaOH (01N) afin d'éliminer l'effet inhibiteur de l'acidité (**El moualedi *et al.*,2005**). Dans notre étude nous avons choisis des souches cibles à catalase positive afin d'éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques.

La mise en évidence de cette activité est réalisée selon la technique de diffusion en puits décrites par Tagg et Given (1971). Le milieu de culture (Mueller Hinton) estensemencé en profondeur par les suspensions cellulaires des souches cibles, après solidification du milieu, des puits de 5mm de diamètre environ sont pratiqués dans des conditions stériles, à raison de deux puits par boîte, chaque puit correspond à une souche de bactérie lactique, rempli avec le surnageant correspondant à cette dernière.

Les boîtes de pétri sont pré incubées pendant 2 à 4h à 4°C afin de permettre la diffusion radicale de l'agent inhibiteur, suivie d'une incubation pendant 24h à 30°C (**Allouche *et al.*,2010**), et en anaérobiose pour éviter la formation de peroxyde d'hydrogène .

En fin d'incubation, l'estimation du degré d'activité bactériocinogénique se fait par la mesure des diamètres d'inhibition autour des puits exprimés en mm, une inhibition est notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition sera supérieur à 2mm (**Doumandji *et al.*,2010**).

4- Test de l'activité enzymatique des souches de bactéries lactiques sélectionnées

4.1- Test de l'activité protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques sélectionnées, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée.

Deux puits de 5 mm sont pratiqués à l'aide de l'extrémité large d'une pipette pasteur stérile dans chaque boîte, chacun de ces puits reçoit un volume de 20µl de surnageant des bactéries lactiques (chaque puit correspond à un surnageant d'une bactérie lactique), un témoin est préparée à partir d'écoulement de gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10%, les puits sont remplis par un simple bouillon MRS (**Veuillemard, 1986**) et on passe à l'incubation des boîtes à 37°C pendant 24h .

4.2- Test de l'activité lipolytique

Pour déterminer l'activité lipolytique des bactéries lactiques sélectionnées, la gélose MRS tamponné à pH 7 et additionné de 1% de Tween 80 a été coulée, solidifiée et séchée. Deux puits de 5mm sont pratiqués à l'aide de l'extrémité large d'une pipette pasteur stérile dans chaque boîte, chacun de ces puits reçoit un volume de 10µl de surnageant des bactéries lactiques (chaque puits correspond à un surnageant d'une bactérie lactique), un témoin est préparée à partir d'écoulement de gélose MRS tamponné à pH 7 et additionné de 1% de Tween 80, les puits sont remplis par un simple bouillon MRS et on passe à l'incubation des boîtes à 37°C pendant deux jours (**Guiraud, 2003**).

Conclusion Générale

Cette étude comporte deux parties principales. La première, est l'isolement et la sélection des bactéries lactiques à partir du lait de chamelle fermenté. La seconde est consacrée à la mise en évidence de l'activité antibactérienne et enzymatique des souches sélectionnées.

En effet, l'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS, a permis de sélectionner au hasard quarante souche (BL1,.....,BL40), après un examen macroscopique, microscopique et un test catalase on a sélectionné quatorze souches (BL4, BL5, BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24, BL25, BL34 et BL40) ces dernière sont testées contre trois souches cibles qui sont : *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella sp.*

La détection des souches lactiques productrices des bactériocines est basée sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production des bactériocines est détectée par le pouvoir inhibiteur des surnageants des bactéries lactiques sur la croissance des souches cibles. Après centrifugation, les surnageants sont neutralisés avec une solution de NaOH (01N) afin d'éliminer l'effet inhibiteur de l'acidité. Dans notre cas nous avons choisis des souches cibles à catalase positive afin d'éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène produit par la bactérie lactique.

BL4, BL5, BL6, BL34, BL40 présentent respectivement des zones d'inhibitions contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) avec des diamètres de l'ordre de : 13mm, 15mm, 16mm, 14mm et 15mm.

BL4, BL5, BL34 et BL40 présentent respectivement des zones d'inhibitions contre *Klebsiella sp* avec des diamètres de l'ordre de : 13mm, 12mm, 7mm et 14mm.

BL4, BL5, BL34 et BL40 présentent respectivement des zones d'inhibitions contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) avec des diamètres de l'ordre de : 12mm, 12mm, 15mm et 15mm.

L'évaluation de l'activité enzymatique est basée sur le principe de diffusion de l'extrait brut dans un milieu de culture solide contenant le substrat adapté, l'apparition d'un halo clair autour des puits contenant les cultures jeunes des bactéries testées indique la présence d'une activité enzymatique et l'estimation de son diamètre évalue son importance .

Toutes les bactéries lactiques testées présentent une activité protéolytique relativement important par contre aucune d'entre elles n'a présenté d'activité lipolytique.

En conclusion ces résultats nous ouvrent vers différentes perspectives:

- Une identification phénotypique et moléculaire des souches actives sélectionnées.
- L'utilisation des techniques moléculaires non culture dépendante comme la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) pour détecter même les bactéries non cultivables .
- Purification et caractérisation des molécules (bacteriocines ou enzymes) à l'origine des résultats obtenus .
- Elargir le panel de cibles testées et évaluer l'antagonisme contre d'autres bactéries pathogènes dans le secteur alimentaire ou sanitaire.

Tableau 3: Résultats de l'examen macroscopique.

Souche	Forme	Surface	Aspect de surface	Couleur	Consistance	Opacité
BL 1,2...10 BL 13,14 BL 16, 17	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
BL15	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Jaune	Crémeuse	Opaque
BL 23, 25,26,27	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
BL22, BL28	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Jaune	Poudreuse	Opaque
BL19, BL21	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
BL20	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Jaune	Crémeuse	Opaque
BL(31, 32), BL(34, 35)	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque
BL(29,30, 33, 37, 38)	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Jaune	Crémeuse	Opaque
BL36	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Jaune	Poudreuse	Opaque
BL39, BL40	Arrondie	Bombée	Lisse, Brillante	Blanchâtre	Crémeuse	Opaque

1-Isolement et sélection des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques, à partir d'échantillon de lait camelin (**Fig.19**), a permis de sélectionner 40 souches (**BL1, BL2BL40**). La sélection est réalisée au hasard en repiquant les colonies à partir des différentes dilutions obtenues.

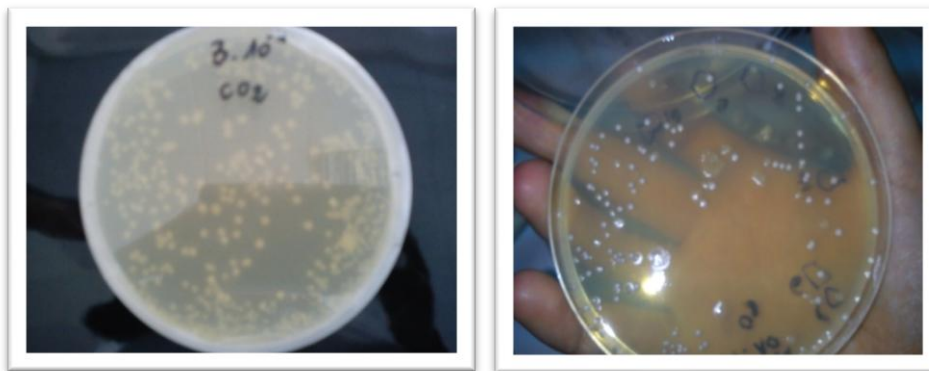


Fig19. Exemples des résultats d'isolement des bactéries lactiques sur MRS, à partir d'échantillon de lait camelin.

1.1 Observation macroscopique :

La description des colonies formées après incubation à 30°C pendant 72h en aérobiose et en anaérobiose sont présentés dans le **tableau 3**. Les colonies sont opaques de couleur jaune, blanchâtre et crème, elles présentent une texture (consistance) crémeuse, leur surface est lisse et brillantes, leur forme est ronde et bombée avec un contour régulier .Les caractéristiques de ces colonies se rapprochent de la description des bactéries lactique (**Petranxuene et Lapiéd. 1981**).

1-2 Observation microscopique

Après l'observation microscopique des cellules, la coloration de Gram et le test de catalase, nous avons trouvés que 14 souches seulement étaient Gram-positives et ne produisant pas de catalase. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches répandent aux caractéristiques générales des bactéries lactiques qui sont : Gram-positif, catalase négative et présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques des bactéries lactiques (**Bourgois, 1996 ; Guiraud, 1998 ; Corrieu et Luquet. 2008**).

Tableau 4 : Résultats des tests d'identification morphologique et physiologique.

Test Souche	Gram	Catalase	Forme cellulaire	Mode de regroupement
BL1	+	-	Cocci	Diplocoque, amas
BL2, BL18, BL19, BL22, BL39	-	-	Cocci	Diplocoque, amas, chaînette
BL 3, BL20, BL29	-	+	Cocobacille, cocci	Diplocoque, chaînette
BL4, BL34	+	-	Cocci	Diplocoque, chaînette
BL5, BL25	+	-	Cocci, bacille, cocobacille	isolée
BL6, BL24	+	-	cocci	amas
BL7, BL21	+	-	cocci	Diplocoque, amas
BL8, BL37, BL38	+	+	Bacille	Amas, isolée
BL9	+	-	Cocci	Tétrade, amas, diplocoque
BL10	+	-	Cocci, cocobacille	Diplocoque, amas
BL11, BL27, BL28	-	+	Bacille	Isolée, amas
BL12, BL13, BL14, BL17	+	-	Cocci	Diplocoque, amas
BL15, BL16, BL 26, BL30, BL35	+	+	Cocci	Diplocoque, amas
BL23, BL36	-	-	Bacille, cocobacille	Isolée, amas
BL31, BL32, BL33	-	+	Cocci	Isolée, amas
BL40	+	-	Cocci	Diplocoque, chaînette

Les isolats en forme de cocci ou coccobacilles sont les plus dominants en association avec quelques bacilles.

Ces résultats sont aussi en accords avec ceux rapportés par Zadi et Karam (2005), où quatre-vingt-une souches de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées à partir de lait de chamelle de la région de Timimoune. Les genres bactériens rencontrés dans leurs échantillons sont représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. (Fig.20, Tableau 4)

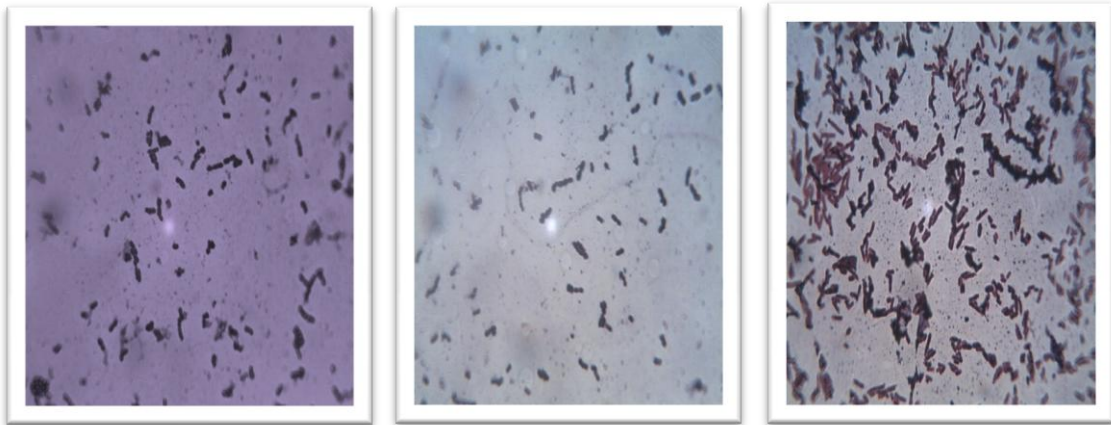


Fig 20. Exemples de résultats de la coloration de Gram de quelques isolats.

Tableau 5 : Activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques évaluée en (mm) de diamètre de la zone d'inhibition.

Souches cibles Bactéries Lactiques	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Klebsiella sp.</i>
Témoin	-	-	-
BL4	13mm	12mm	13mm
BL5	15mm	12mm	12mm
BL6	16mm	-	-
BL7	-	-	-
BL9	-	-	-
BL10	-	-	-
BL12	-	-	-
BL13	-	-	-
BL14	-	-	-
BL17	-	-	-
BL24	-	-	-
BL25	-	-	-
BL34	14mm	15mm	7mm
BL40	15mm	15mm	14mm

Test négatif : (-)

2- Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées

Sur l'ensemble de quatorze souches sélectionnées pour le test, cinq souches ont présenté une activité antibactérienne contre les trois souches cibles qui sont : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Klebsiella sp.* ont présenté une sensibilité à cette activité.

a- Pouvoir d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

BL4, BL5, BL6, BL34, BL40 présentent respectivement des zones d'inhibition avec des diamètres de l'ordre de : 13mm, 15mm, 16mm, 14mm et 15mm (**Tableau 5**).

Les autres souches testées n'ont pas présenté d'activité inhibitrice contre leur cible (**Fig.21**).

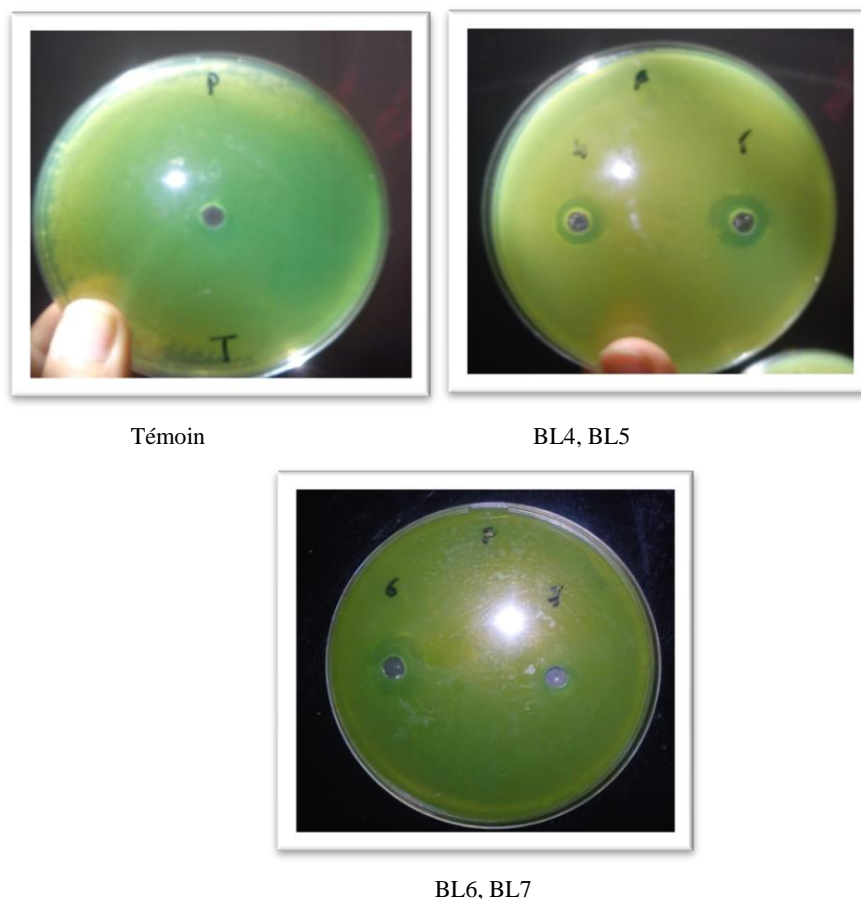


Fig 21. Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL6 et BL7 contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

b- Pouvoir d'inhibition de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Seules BL4, BL5, BL34 et BL40 ont une activité contre la cible testée. Les diamètres des zones d'inhibitions sont respectivement : 12mm, 12mm, 15mm et 15mm. Les autres surnageants sont négatifs (**Fig.22, Tableau 5**)

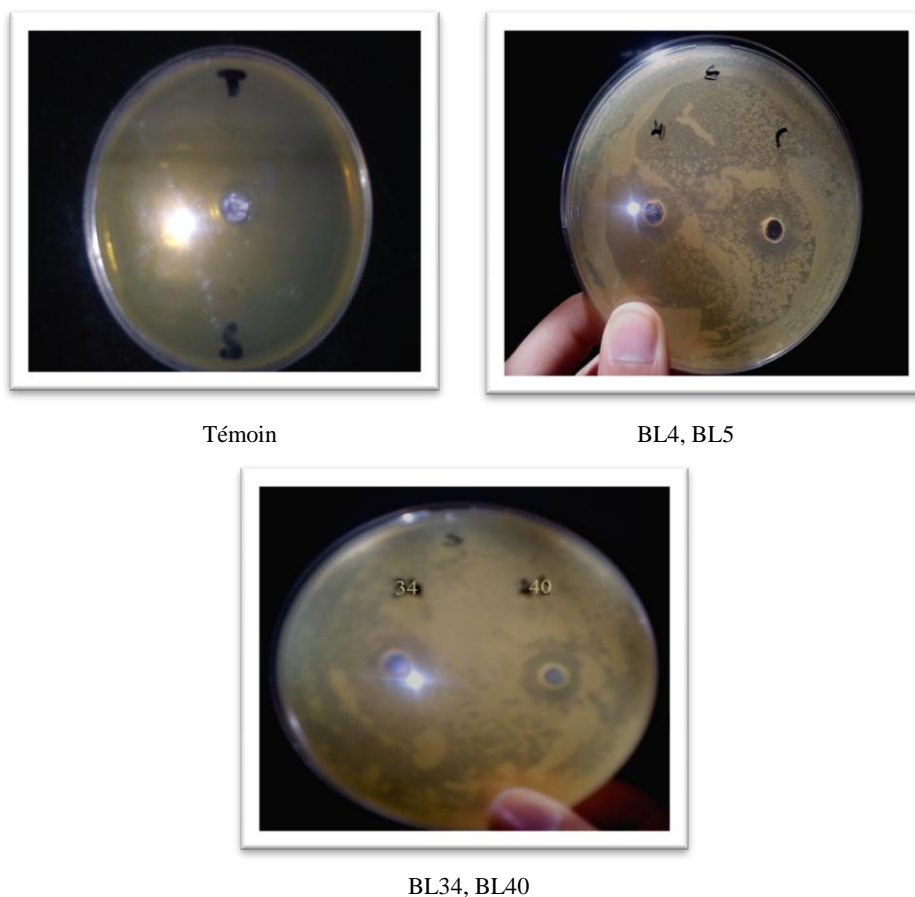


Fig 22. Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL34 et BL40 contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

c- Pouvoir d'inhibition de *Klebsiella sp.*

BL4, BL5, BL34 et BL40 présentent respectivement des zones d'inhibitions avec des diamètres de l'ordre de : 13mm, 12mm, 7mm et 14mm. (Tableau 5). Les autres surnageants des souches : BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24 et BL25 ne présentent pas un effet inhibiteur (Fig.23).

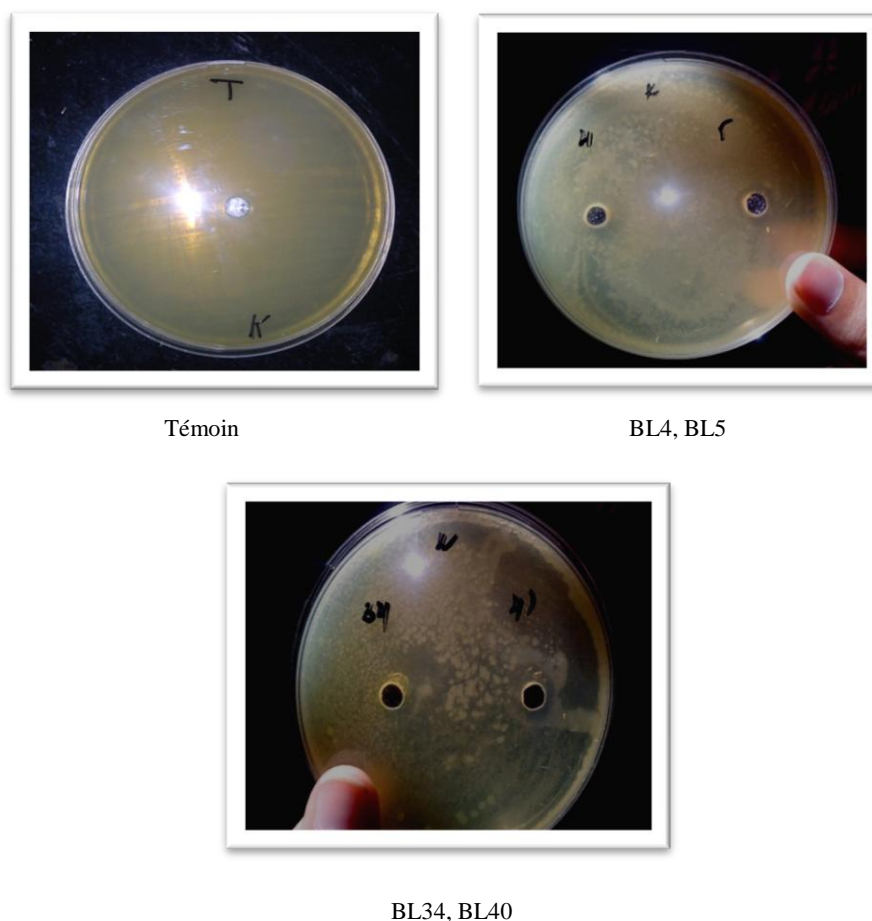


Fig 23. Zones d'inhibition des quatre souches BL4, BL5, BL34 et BL40 contre *Klebsiella sp.*

Dans des conditions expérimentales éliminant l'influence de l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène, l'ensemble des résultats obtenus présente une activité antibactérienne, due à l'action des bactériocines, a révélé un spectre d'inhibition important, dirigé notamment vis-à-vis des souches cibles : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Klebsiella sp.* (Tahara et Kanatani, 1996). L'antagonisme est noté positif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2mm (Doumandji *et al.*,2010).

Les résultats obtenus dans notre étude concernant les souches des bactéries lactiques (BL4, BL5, BL6, BL34 et BL40) testées vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), se rapprochent de ceux cités dans la littérature. Les bactériocines produites sont spécifiques aux souches cibles qui sont leurs indicateurs de production (Daba *et al.*,1994). Les travaux similaires ont rapporté que la bactériocine produite par la souche BL_{h5} isolée à partir de jus de presse de canne, dont la fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien contre celle-ci (Labioui *et al.*,2005).

Les travaux d'Allouche *et al.*,2010, dans l'industrie laitière ont montré que les souches trouvés sont des lactobacilles, ces dernier présentent une activité inhibitrice importante contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus lors de notre étude concernant les souches des bactéries lactiques (BL4, BL5, BL34, BL40) testées contre la souche pathogène *Klebsiella sp.*, se rapprochent à celle obtenue par Labioui *et al.*,2005, rapporté que La souche BL_{h5} isolée à partir de jus de canne à sucre, présente une activité bactéricide forte sur *Klebsiella*, avec une zone d'inhibition importante.

Il est aussi important de noter que les souches BL4, BL5, BL34 et BL40 ont présenté un antagonisme contre les trois cibles testées. Ce qui indique probablement que les bactériocines produites ne sont pas seulement spécifiques aux souches cibles et qui pourraient s'étendre à d'autres pathogènes.

Tableau 6: Résultats de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.

Souche	Diamètre de la zone claire (mm)
Témoin	0
BL4	11
BL5	12
BL6	14
BL7	12
BL9	12
BL10	12
BL12	13
BL13	12
BL14	12
BL17	11
BL24	14
BL25	12
BL34	12
BL40	12

3- Activités enzymatiques des bactéries lactiques

a- Pouvoir protéolytique

Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le **tableau 6**. Il ressort du tableau que toutes les souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des puits (**Fig.24**).

Selon Veuillemard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient comprises entre 11 et 14mm.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Karam, Hassaine et Karam (2007), qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir de lait de chamelle de Timimoun, présentent un caractère protéolytique.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (**Savoy et Hébert. 2001 ; Hassaine et al.,2007**).

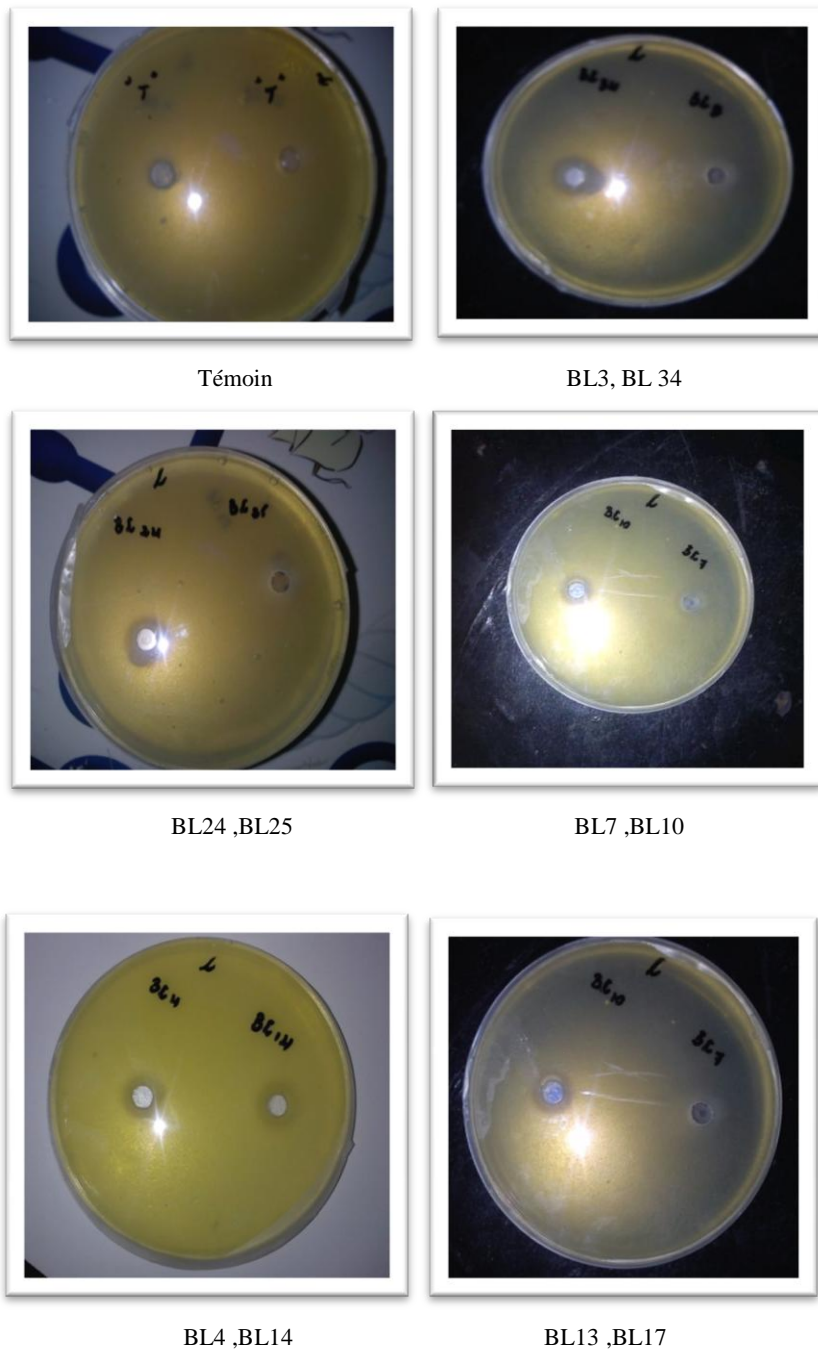


Fig 24. Activité protéolytique des bactéries lactiques testées.

b- Pouvoir lipolytique

Il apparaît que l'ensemble des bactéries lactiques ne présentent pas du tout d'activité lipolytique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Crow et al., 1994 et Béal et al., 2008 qui ont montré que les lactocoques possèdent une faible activité lipolytique et que les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques. Cela est probablement dû à l'activité estérasique qui n'est pas nécessaire à la croissance des bactéries lactiques (**Fernandez et al., 2000**).

-A-

Afnor. (2001). Lait Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode gravimétrique (méthode de référence) NF EN ISO. 21p.

Akli Bordjah. (2011). Analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-ecreme, par .centre de formation professionnelle El Hidhab Sétif Algérie - BTS en contrôle de qualité dans les industries agroalimentaires .

Alais C, Linden G. (1987). Science du lait : principe des techniques laitières. Abrégé de biochimie alimentaire. ED Masson, Paris.

Alioua Houria. (2011) .Publié dans El Watan le 31 - 01 –.2011.

Allouche Fella Naouel., Amina Hellal., Abdenour Laraba. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacillus thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Revue « Nature et Technologie ». N°03/Juin2010. Pages 13 à 20.

Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., Perdigon, G., de Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. Chem Pharm Bull 44: 2263-2267.

Amellal H. (1995). La filière lait en Algérie: entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. Options Méditerranéennes, Sér. B. n°14,- Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., 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.

Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I. & Koidis P. (2008). Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. Bioresource Technol., 99(14), 6646-6650.

Asaduzzaman, S. M., Nagao, J., Aso, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006). Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Appl Environ Microbiol.*72: 6012-6017.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.

Axelsson, Ouwehand, A. Editors Salminen, S.;von Wright, A.;Ouwehand, A. (2004). Book *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* pp. xiii + 633 pp. Additional Title Information *Food Science & Technology* 139 ISBN 0-8247-5332-1.

-B-

Benkarroum, N., Ghouti., Sandine,W.E., Tantaoui-Eiraki,A.(1993).Method to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins-Lett.*Appl.Microbiol.*,17(2),Pp:78-81
biotechnological production. *Appl.Microbiol.Biotech.*64: 16-27.

Benkerroum, N. and Tamime, A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21: 399–314.

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.

Bierbaum, G., and Sahl, H. G. (2009) .Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* .10: 2-18.

Bir el Ater Location Guide.

Birri, D. J., Brede, D. A., Forberg, T., Holo, H., and Nes, I. F. (2010). Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol.*76: 483-492.

Björkroth, J., and Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (3rd edition). Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P. (1996). *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires.* Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.

Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P. F., Goodfellow, M. et Cogan, T.M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. and Environ. Microbiol.*68 (2): 820-830.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol.*3: 238-250.

Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., and Sahl, H. G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.*42: 154-160.

-C-

Caplice, E., Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 131-149.

Carine DORTU et Philippe THONART. (2009). volume 13 - numéro 1. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and van der Donk, W. A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev.*105: 633-684.

Chaumont P. (2005). Lait, produits laitiers, nutrition et santé : de la science à l'idéologie. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 40, n° Supplément 1, p. 641-644

Chung, K. T., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. (1989). Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol.*55: 1329-1333.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005).Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.*3: 777-788.

Crow V.L., Holland R., Pritchard G.G. et Coolbear T., (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 4 : 723-742.

-D-

Daba H. Lacroix C., Hung J., Simard RE., Lemieux L. (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J Appl Bacteriol* 77: 682-688.

Das, S., Holland, R., Crow, V. L., Bennett, R. J. et Manderson, G. J. (2005). Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese. *Int. Dairy Journal.*15: 807-815.

De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994). Bactéries lactiques. Vol. I et II, Edition Loriga.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., and Hill, C. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.*16: 1058-1071.

Dellaglio F. ; DE Roissart H. ; Torriani S. ; Curk M.C. ; Janssens D. (1994).Caractéristiques générale des bactéries lactiques in « Bactérie lactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

Derby. (2001) .Lait, nutrition et santé, Ed : Tec et doc, Lavoisier, Paris.

Desmazeaud et De Roissart. (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques in « Bactérie lactique ». De Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.

Desmazeaud M.J. (1983). Lait, 63, 267-316.

Dicks, L. M. T., Heunis, D. A., van Staden, D. A., Brand, A., Sutyak Noll, K., and Chinkindas, M. L. (2011). Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.

Dictionnaire médical ; <http://www.looksante.fr/dictionnaire-medical/>.

Diep, D. B., and Nes, I. F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. Curr Drug Targets .3: 107-122.

Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc Natl Acad Sci U S A.104: 2384-2389.

Dițu, L. M., Chifiriuc, C., Lazăr, V., and Mihăescu, G. (2009). Implication of quorum sensing phenomenon in the expression of genes that code for bacteriocines in lactic bacteria. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.54: 147-166.

Doleyres Y., Paquin C., Leroy M. et Lacroix C. (2002). Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. App. Microbiol. Biotechnol. 60 : 168-173.

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

Doumandji A., Hellal A., Saidi N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de Lactobacillus acidophilus 11. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 4, N°2, p : 25-47.

Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P., and Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol.*183: 4509-4516.

-E-

El Khasmi M., Riad F., Safwate A., El Abbadi N., Farhm., Faye B., Coxam V. (2005). La chamelle allaitante face au stress calcique : une fonction endocrine adaptée aux conditions désertiques. *Science et changement planétaire. Sécheresse* volume 16. N° 4. p261-267.

El Moualdi, M., Labioui, H., El Yachioui, M., Ouhssine, M. (2005). Sélection des souches des bactéries lactiques antibactérienne.

El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jacobsen, M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10), 913-916.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K. D. (1994). Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol.*60: 814-825.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev.*24: 85-106.

Evershed RP, Payne S, Sherratt AG et Als. (2008) .Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding, *Nature*, 455:528-531.

-F-

Falagas, M. E., Betsi, G. I., and Athanasiou, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.*58: 266-272.

FAO et OMS. (2003).NORME CODEX POUR LES LAITS FERMENTÉS. Lait et produits Laitiers (2ème édition).P6 . /codex stan 243.

FAO .(2006). Le lait de chamelle a le vent en poupe La FAO lui prédit un brillant avenir.

Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Coolbear T., Holland R. et Kuipers O.P., (2000).Cloning, characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.* 66 : 1360-1368.

Fickers, P., Destain, J. et Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., and Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci.*11: 688-696.

-G-

Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., and Lucas, R. (2011). Food Applications .98: 1316-1325.

George A. Burdock. (1997). Encyclopedia of food and color additives, CRC Press. 3153 p.

Gilarová, R., Voldrich, M., Demnerová, K., Cerovský, M., and Dobiás, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.*24: 315-319.

Gonfa A. (2001).literature review Foster H.A et al. Field survey and literature review on traditional fermented milk product of Ethiopia. *International J of Food Microbiology*, 68, 173-186.

Gorban A.M.S. and Izzeldin O.M. (1996). Study on cholesteryl ester fatty acids in camel milk lipid. *International J. Food Sci. Techn.* 34, p229-234.

Grippon J.C., Desmazeaud M.J., Le Bars D., Bergère J.L. (1977). *Lait*, 55, 502-516.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.*98: 1316-1325.

Guiraud J.P. et Galzy P. (1980). L analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l usine nouvelle. 1-239.

Guiraud J.P. (1998). Analyse du lait. Microbiologie alimentaire. Ed DUNO.651.

Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. 1e Ed., Dunod. Paris. 136-144.

Guiraud J.P. (2003). Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In :Microbiologie alimentaire. Paris.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.

Guiraud J.P. et Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.

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

-H-

Haldenwang, W. G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.*59: 1-30.

Hammes, W. P., and Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds).

The prokaryotes, Vol. (4). Springer Science and Business Media. New York, USA. Pp 320-403.

Hancock, R. E. (2000). Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.

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 (14) : 1720-1727.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B., and Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol.*16: 229-240.

Heng, N. C. K., Welcome, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.

Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Moll, G. N., and Driessen, A. J. (2001). Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother.*45: 901-904.

Huot Isabelle.(2013). *Conseilsnutrition.tv*.

-I-

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. 179.

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

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et 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.

-J-

Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Houteghem, N.V., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Impe, J. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5), 1601-1611.

Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D., and Nissen-Meyer, J. (2004). Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 70: 2647-2652.

Jung, G. (1991). Lantibiotics, a survey. In: Jung, G., and Sahl, H.-G. (Eds). *Nisin and Novel Lantibiotics.* Escom. Leiden The Netherlands. pp 1-34.

-K-

Kabuki, T., Uenishi, H., Seto, Y., Yoshioka, T., and Nakajima, H. (2009). A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges. *J Appl Microbiol.* 106: 853-862.

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

Kamoun M., (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects quantitatifs et aptitude à la transformation. *Option Médit.*, 13.p81-103.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*.70: 337-349.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*.12: 39-85.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*.41: 103-125.

Kobilinsky, A., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F. (2007). Modeling the inhibition of *Salmonella Typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol*. 115, 95-109.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J., and de Vos, W. M. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*.270: 27299-27304.

-L-

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 144 : 237-250.

Larpent J.P., Copin M. P., Germonoville A., Jacquet M.,Thetas J. L. (1997). Microbiologie du lait et des produit laitier in : «microbiologie alimentaire » ed. Laprent, tec. Doc., 1 ère Ed., Lavoisier, Paris.

lavache.chez.com.

Law J. et Haandrikman A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*. 1-11.

Leveau J.Y. et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.

Liu, S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2), 115-131.

Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., and Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci.*65: 455-476.

Luquet F.-M., Corrieu G. – Lavoisier. (2008). Bactéries lactiques De la génétique aux ferments.

-M-

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

Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H., and Holzappel, W. H. (1992). Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology.*16: 167-172.

Mal, G. et Pathak K.M.L. (2010). Camel milk and milk products. Milk & milk products. National Research Centre on Camel, Bikaner, Rajasthan. India.

Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E., and Martinez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*32: 2-22.

Marchal N., Obre A., Buttion R., Boudon J.L. et Richard C.L. (1982). Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris.

Mathieu A., (1998). Fresh soft white cheese (Domiaty type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation. *J. Dairy Sci.*, 6, 2845-2855.

McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol.*31: 393-403.

Ministère de l'Agriculture et FAOSTAT. (2012).

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.

Moretro T., Aasen I.M., Storro I. & Axelsson L. (2000). Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88(3), 536-545.

Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.* Blackwell. Publishing. 13.

-N-

Nagao, J., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006). Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J Biosci Bioeng.*102: 139-149.

Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. & Dicks L.M. (2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 1131-1138.

Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2010). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.*2: 52-60.

Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Operand, C., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 10: 19-37.

-O-

Ould Hamouda Wassila. (2012).Horizons quotidien national d'information, économie.Les Algériens consomment 1,5 milliard de litres de lait par an.Publié le 20 mai 2012 .

-P-

Parente E. & Ricciardi A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 628-638.

Petranxuene, P. et Lapied, L., (1981). Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, analyses et tests 2^{ème} édition, technique et documentation-Lavoisier-Paris.P :44, 46, 63 et 81.

Pèrez Guerra N. et al. (2005). Fed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. Biotechnol. Appl. Biochem., 42, 17-23.

Ping Kang; Yin Yu-Long; Zhen Ruan. (2008). Effect of replacement of lactose with partially hydrolysed rice syrup on small intestine development in weaned pigs from 7 to 21 days. Journal of the science of food and agriculture Y, vol. 88, No. 11, pages 1932-1938.

Pongtharangkul T. & Demirci A. (2006). Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor.Biotechnol. Prog., 22, 217-224.

Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.

-R-

Rodrigues, U. M., Aguirre, M., Facklam, R. R., and Collins, M. D. (1991). Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol.*71: 509-516.

Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E. (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* 34 (2) : 218-227.

-S-

Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol Lett.*270: 227-236.

Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 394-406.

Savoy de Giori G. et Hébert M. (2001). Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology, Vol. 14: Food Microbiol. Protocols.* Humana Press.Totowa. 197-202.

Sawaya W. N., Kkalil J.K., Al-Shalhat A. et al-Mohammad H.(1989). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci.*, 49, 744-747.

Sboui Amel, Touhami Khochani, Mongi Djegham et Omrane Belhadj. (2009).Afrique *SCIENCE* 05(2) 293 – 304.

Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., and Ciampi, L. (2003). Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*84: 237-244.

Shah SA, Sander S, White CM, Rinaldi M, Coleman CI. (2007). University of Connecticut School of Pharmacy, Storrs, CT, USA. Erratum in Lancet Infect Dis. Sep; 7(9):580.

Siboukeur O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-Harrach-Alger.

Smiddy M.A ; Martin J; Kelly A ; De Kruif G ; Huppertz T.(2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase, vol. 89, no6, pp. 1906-1914.

Souki H. (2009). Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie : portée et limites. Revue Campus N°15. Revue Scientifique trimestrielle. Université Mouloud Mammeri. Tizi- Ouzou.

Sprules, T., Kawulka, K. E., and Vederas, J. C. (2004). NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. Biochemistry.43: 11740-11749.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek.70: 331-345.

Strus, M., Gosiewski, T., Kochan, P., Heczko, P.B. (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immuno. Medical Microbiol. 48, 56-63.

-T-

Tagg, J.R. And Mc, Given, A.R. (1971). Appl.Microbiol. 21-943

Tahara T. et Khanatani K. (1996). Isolation partial characterisation and mode of action of andocin J 1269, a bacteriocin produced by *lactobacillus acidophilus* JCM 1229.J. Appl. Bacteriol, 669-677.

Tamime A.Y. (2002). Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

Terroin E.F. (1966). Technique de détection et de dénombrement des microorganismes du lait. Cahier technique .édition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 50p.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 239-290.

Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. Bull. Int. Dairy Fed. 120: 4–10.

Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., and Hill, C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie Van Leeuwenhoek.82: 165-185.

-V-

Van Heusden, H. E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2002). Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. Biochemistry.41: 12171-12178.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev.60: 407-438.

Verluyten J., Leroy F. & De Vuyst L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. Appl. Environ. Microbiol., 70, 5081-5088.

Veuillemard J.C. (1986). Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 1-65.

Vilain A-C. (2010). Qu'est-ce que le lait ? Revue française d'allergologie, vol. 50, n° 3, p. 124-127.

Vollenweider, S. (2004). 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech. 64, 16-27.

-W-

Wei-Tse Lan, Y-Sheng Chen, and Fujitoshi Yanagida. (2009). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-dong-gua, a traditional fermented food in Taiwan; Journal of bioscience and bioengineering VOL.108 No.6,484-487.

Williams A.G., Noble J. et Banks J.M.(2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. Int. Dairy J. 11: 203-215.

www.fromagium.fr.

-Y-

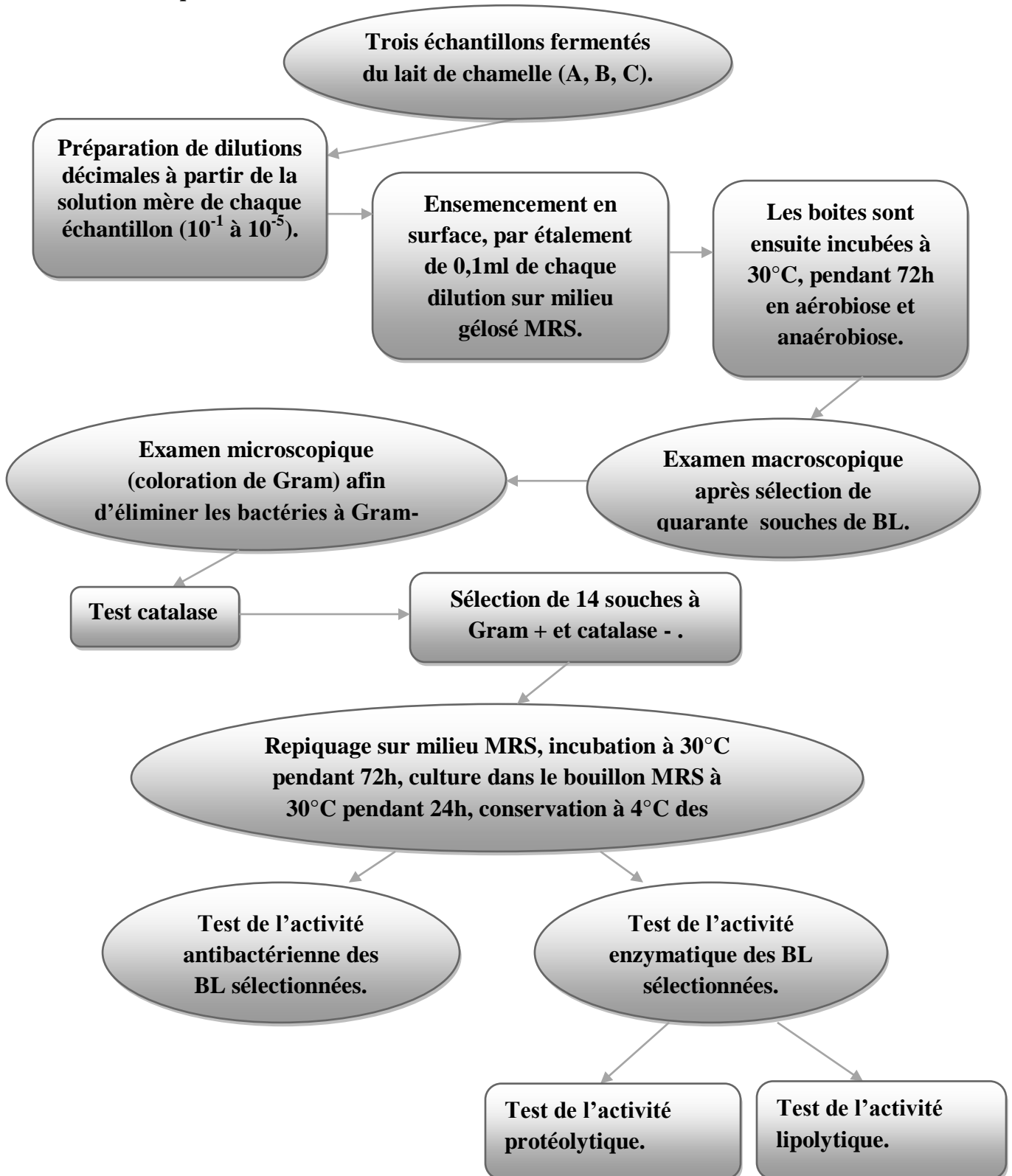
Yagil, R., Zagoski, O., Van Creveld, C. (1998). Science and camel's milk production: some keys for nutrition and marketing. Actes du colloque : « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994, Collection Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 79-86.

Yakhlef H. (1989). La production extensive de lait en Algérie .CIHEAM. Options méditerranéennes- Serie Séminaires – N° 6 : 135-139.

-Z-

Zalan, Z., Barath, A., Halasz, A. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. Food Technol. Biotech. 43(3), 219-225.

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., and Hamida, J. B. (2010). A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. Protein J .29: 432-439.

Annexe 1**➤ Protocole expérimentale**

Annexe 2

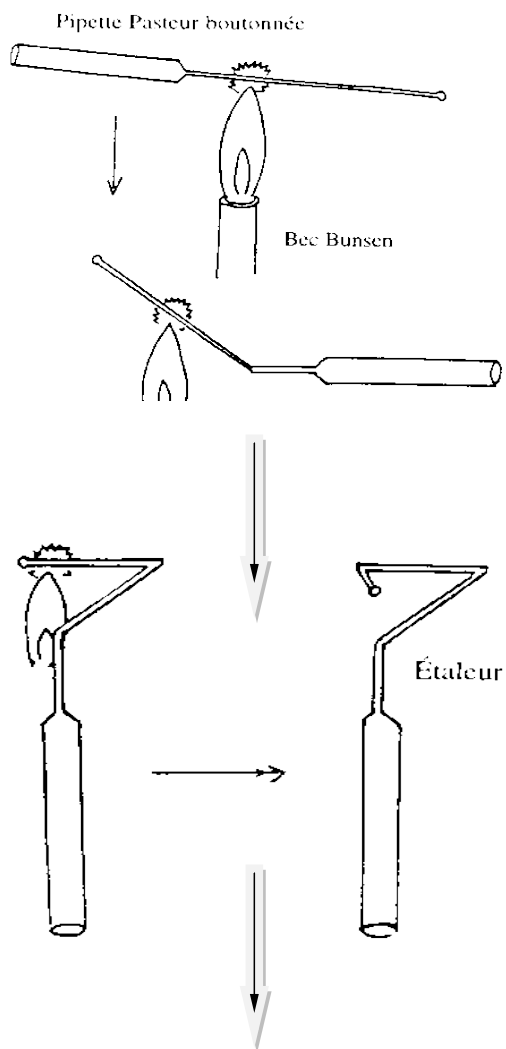
➤ ***M.R.S. gélose (Gélose de Man ; Rogosa et Sharpe)***

- * Peptone : 10 g ;
- * Extrait de viande : 10 g ;
- * Extrait de levure : 5 g ;
- * Glucose : 20 g ;
- * Tween 80 : 1 mL ;
- * Acétate de sodium : 5 g ;
- * Citrate d'ammonium : 2 g ;
- * Phosphate monoacide de potassium : 2 g ;
- * Sulfate de manganèse : 0,05 g ;
- * Sulfate de magnésium : 0,20 g ;
- *Eau distillée : 1000 mL.

Le pH final de ce milieu doit être compris entre 6,5 et 6,9. Répartir en flacons de capacité adéquate. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 3

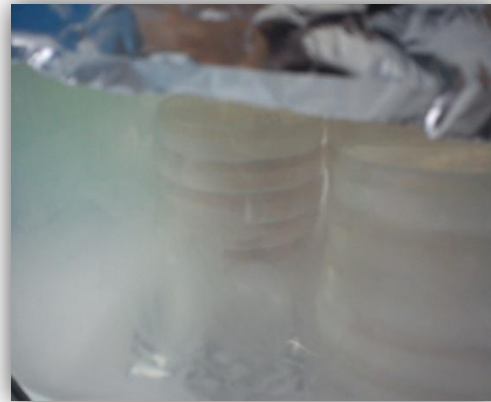
➤ ***Fabrication d'un râteau d'étalement***



Annexe 4

➤ ***La méthode à la bougie (anaérobiose)***

Pour la méthode à la bougie: une anaérobiose enrichie en CO₂ peut être facilement réalisée en utilisant un récipient fermé dans lequel on place une bougie allumée à côté des boîtes de Pétri. Le récipient est fermé et la bougie s'éteint au bout de quelques instant en ayant consommé de l'oxygène et libéré du gaz carbonique (Wei-tse lan et al., 2009).



La méthode à la bougie (anaérobiose)

Annexe 5

➤ *Coloration de Gram*

- Préparation de frottis

Au moyen d'une boucle d'inoculation, on dépose un peu d'eau sur une lame porte objet propre, puis on mélange à cette eau un tout petit peu de matériel prélevé sur une colonie pour obtenir une suspension de cellules. Avec la même boucle, on étale cette suspension sur une surface d'un ou deux centimètres carrés et on laisse sécher – on obtient un frottis. Le frottis est ensuite fixé par deux passages rapides dans la flamme d'un bec bunsen (Guiraud et Gazly, 1980).

Le frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95%). Il s'agit là de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram-négatives seront incolores, les cellules Gram- positives violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine basique diluée, pour colorer en rouge les cellules Gram-négatives présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif (x100) à immersion (Guiraud et Gazly, 1980).

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

Annexe 6

➤ **Test de la catalase**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram + (Guiraud,1998).

Techniques

*Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes,

*A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien (Allay et al. 2001).

*Observer immédiatement

*Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose, déposer une goutte d'eau oxygénée (Allay et al. 2001).

*Observer immédiatement

Résultats

➤ **catalase +** ———— { L'Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène.

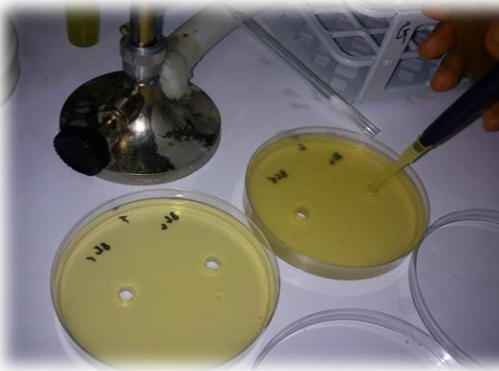
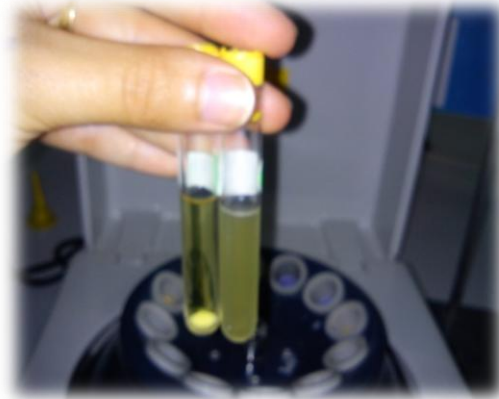
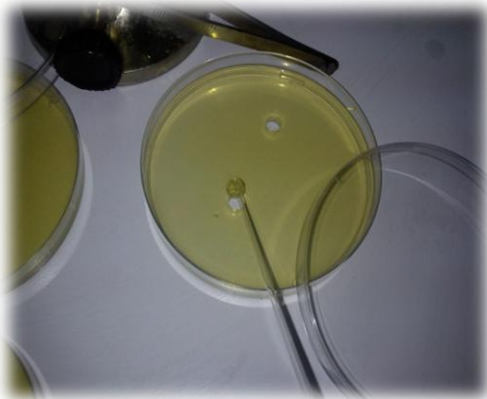
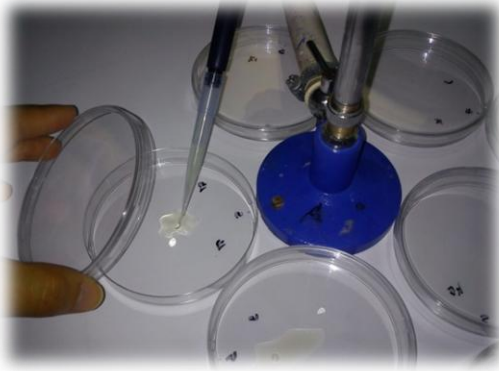
➤ **catalase -** ———— { Pas de bulles.

Annexe des photos

- Echantillonnage (04/05/13)



- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques



Annexes

Résumé

Mise en évidence de l'activité antibactérienne et enzymatique des bactéries lactiques isolées à partir de lait camelin du sud-est algérien

Le lait de chamelle se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en acides organiques, en peroxyde d'hydrogène et en bactériocines produites par les bactéries lactiques.

L'étude inscrite dans ce cadre consiste à étudier d'une part, l'activité antibactérienne des bactériocines produites par les souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle fermenté ensemencées sur milieu MRS, contre les trois souches : *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella sp.*, et d'autre part l'activité enzymatique protéolytique et lipolytique.

Des examens macroscopiques, microscopiques, ainsi qu'un test catalase ont permis de sélectionner quatorze souches lactiques (BL4, BL5, BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24, BL25, BL34 et BL40).

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les souches cibles est réalisée par la méthode des puits, l'activité est traduite par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits, parmi les quatorze souches testées : Cinq ont une activité contre les souches cibles : (BL4, BL5, BL6, BL34, BL40) ont une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), (BL4, BL5, BL34, BL40) contre *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) et (BL4, BL5, BL34, BL40) contre *Klebsiella sp.*

Concernant l'activité enzymatique, toutes les bactéries lactiques testées présentent une activité protéolytique par contre aucune d'entre elle ne présentent pas d'activité lipolytique.

Mots clefs : Lait camelin, Bactéries lactiques, Activité antibactérienne, Bactériocine, protéolytique, lipolytique.

Abstract

Camel milk is different from other milk by the presence of a very powerful protective system, with relatively high levels of organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins produced by lactic acid bacteria.

The study within this framework is to consider on the one hand, the antibacterial activity of bacteriocins produced by lactic strains isolated from fermented camel milk plated on MRS medium, against three strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) , *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Klebsiella sp*, and also proteolytic and lipolytic enzymatic activity.

Macroscopic examination, microscopic, and a catalase test were used to select fourteen lactic strains (BL4, BL5, BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24, BL25, BL34 and BL40).

The antibacterial activity of lactic acid bacteria against the target strains is performed by the method of well activity has resulted in the appearance of a zone of inhibition around the wells, among fourteen strains tested: Five have activity against the target strains (BL4, BL5, BL6, BL34, BL40) have activity against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), (BL4, BL5, BL34, BL40) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and (BL4, BL5, BL34, BL40) against *Klebsiella sp*.

On enzyme activity, all lactic acid bacteria tested exhibit proteolytic activity against any of them don't have lipolytic activity.

Keywords: camel milk, lactic acid bacteria, antibacterial activity, bacteriocin, proteolytic, lipolytic.

ملخص

حليب الناقة يختلف عن الألبان الأخرى لاحتوائه على نظام حماية قوي, لم ا فيه من معدلات عالية نسبيا من أحماض عضوية, بيرو كسي الهروجين والبكتيريوسين المنتجة من طرف البكتيريا اللاكتيكية, ودراسنا هذه تدرج في هذا السياق , حيث تدرس من ناحية النشاط المضاد للبكتيريا (البكتيريوسين) الناتج من طرف السلالات اللاكتيكية المعزولة من عينة حليب الناقة *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) المخمر المزروعة في وسط خاص MRS ضد ثلاث سلالات بكتيرية أخرى ضارة *Klebsiella sp.* (ATCC 27853) , *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

ومن ناحية أخرى فهي تدرس النشاط الأنزيمي (المحلل للبروتين و المحلل لدسم)

وفي الوقت ذاته قمنا بإجراء فحوصات مجهريه وبالعين المجردة وفحص آخر للكتلاز فنجم عنها تحديد أربعة عشر سلالة (BL4, BL5, BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24, BL25, BL34 et BL40). لاكتيكية

بعدها قمنا بدراسة نشاطها المضاد للبكتيريا ضد السلالات البكتيرية المستهدفة باستعمال تقنية الثقوب « Puits »

, النشاط ترجم بظهور مناطق الكبح. على محيط الثقوب « Zone d'inhibition »

من بين الأربعة عشر سلالة المختبرة تأكد لنا أن فقط خمسة منها لديها نشاط ضد السلالة المستهدفة :

(BL4, BL5, BL6, BL34, BL40) ضد *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),

(BL4, BL5, BL34, BL40) ضد *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923),

(BL4, BL5, BL34, BL40) ضد *Klebsiella sp.*

هذا أما في ما يخص النشاط الأنزيمي /القاعدة العامة تؤكد أن البكتيريا المبدية لهذا النشاط مبنية على أساس ظهور حيز واضح على جوانب الثقوب هذه الأخيرة تحتوي على مستوطنات نامية أو ناشئة من البكتيريا المختبرة سلفا

من خلال دراستنا اتضح أن كل البكتيريا اللاكتيكية المختبرة أظهرت نشاط إنزيمي محلل للبروتين كما أن ليس لها أي نشاط أنزيمي محلل لدسم

الكلمات المفتاح

حليب الناقة - البكتيريا اللاكتيكية- النشاط المضاد للبكتيريا- البكتيريوسين- محلل للبروتين- محلل للدسم .

BADAoui IMEN MARIR FATMA	
Date de soutenance	Le 26-06-2013.
Thème	Mise en évidence de l'activité antibactérienne et enzymatique des bactéries lactiques isolées à partir du lait camelin du sud-est Algérien.
<p>Le lait de chamelle se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en acides organiques, en peroxyde d'hydrogène et en bactériocines produites par les bactéries lactiques.</p> <p>L'étude inscrite dans ce cadre consiste à étudier d'une part, l'activité antibactérienne des bactériocines produites par les souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle fermenté ensemencées sur milieu MRS, contre les trois souches : <i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC 25923), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) et <i>Klebsiella sp.</i>, et d'autre part l'activité enzymatique protéolytique et lipolytique.</p> <p>Des examens macroscopiques, microscopiques, ainsi qu'un test catalase ont permis de sélectionner quatorze souches lactiques (BL4, BL5, BL6, BL7, BL9, BL10, BL12, BL13, BL14, BL17, BL24, BL25, BL34 et BL40).</p> <p>L'activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les souches cibles est réalisée par la méthode des puits, l'activité est traduite par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits, parmi les quatorze souches testées : Cinq ont une activité contre les souches cibles : (BL4, BL5, BL6, BL34, BL40) ont une activité contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853), (BL4, BL5, BL34, BL40) contre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC 25923) et (BL4, BL5, BL34, BL40) contre <i>Klebsiella sp.</i></p> <p>Concernant l'activité enzymatique, toutes les bactéries lactiques testées présentent une activité protéolytique par contre aucune d'entre elle ne présente pas d'activité lipolytique.</p>	
Mots clefs	Lait camelin, Bactéries lactiques, Activité antibactérienne, Bactériocine, protéolytique, lipolytique.
Membres de jury	Président : Derouiche F. Examineur : Leulmi N. Zraieb.A. Rapporteur : Merabti R.