

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Exploitation des Ecosystèmes microbiens laitiers

THEME

Isolement et identification des *lactocoques* isolés à partir du lait cru de chamelle

Réalisé par :

Mlle. SOLTANA Zohra

Soutenu le : 11/ 06 / 2017

Devant le jury :

Président :Mr. NEMMICHE Said

Examinatrice :Mme.HENNI Nassiba

Encadreur :Mr. BEKADA Ahmed

Co encadreur :Mlle. HOUBAD Khadîdja

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Le lait De Chamelle

I. Le lait.....3

1.1. Les différents laits.....3

1.1.1-Le lait de chamelle3

1.1.2. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimique du lait camelin4

1.1.3. Microbiologie du lait camelin.....5

1.1.4. Propriété médicinale.....5

1.1. 5.Propriété technologique et produits fermentés.....5

I.2.Généralités sur le dromadaire6

I.2.1.Classification6

I.2.2.Production laitière.....7

I.2.3.Les facteurs influençant la production laitière.....7

➤ Type d'alimentation.....7

➤ Rang et stade de lactation.....8

➤ La pratique de traite.....8

➤ La race.....8

➤ Conditions climatiques.....	8
➤ Statut sanitaire.....	8
I.2.4.Importance du dromadaire.....	9
I.2.4.A. Le dromadaire ; animal de transport.....	9
I.2.4.B. Le dromadaire ; animal de selle.....	9
I.2.4.C. Le dromadaire, animal de traction.....	9
I.2.5. Les races algériennes.....	10

Chapitre II : Les Bactéries Lactiques

II.1.Définition et caractéristiques principales.....	12
II.2. Habitat	12
II.3.Taxonomie et classification.....	12
II.4.Exigences nutritionnelles	13
II.4.1. Exigences en acides amines.....	14
II.4.2. Exigences en bases azotées.....	14
II.4.3.Exigences en sels minéraux.....	14
II.4.4. Exigences en cations.....	14
II.4.5. Exigences en vitamines.....	14
II.4.6. Exigences en glucides.....	15
II.5. Importance industrielle des bactéries lactiques.....	15
II.6. Les rôles bénéfiques sur la santé.....	15

Chapitre III : Le Genre *Lactococcus*

III.1.Historique.....	16
III.2. Définition.....	16

III.3.Habitat.....	6
III.4.Taxonomie	17
III.5.Les besoins nutritionnels	17
III.6.Rôle des <i>lactocoques</i>	18
➤ Production d'acide lactique.....	18
➤ Production d'arômes.....	18
➤ Production de bactériocine	19
➤ Production d'agents épaisissants	19
➤ Activité protéolytique.....	19
➤ Activité lipolytique.....	20

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Objectif de travail	21
IV. Matériel et méthodes.....	21
IV.1.Matériel utilisés	21
IV-1.1.Les échantillons étudiés.....	21
IV.1.2. Les milieux de culture utilisés	21
IV.1.3.Produits chimiques et réactifs.....	21
IV.1.4. Appareillage.....	22
IV.2. Méthodes d'analyses.....	22
IV.2.1.Technique d'isolement.....	22
IV.2.2.Techniques de purification.....	23
IV. 2.3.Pré- identification des isolats.....	24
IV.2.3.A. Observation macroscopique.....	24
IV. 2-3-B. Test de la catalase.....	24

IV.2.3.C. Observation microscopique	25
IV.2.4. Tests physiologiques et biochimiques	25
A. Type fermentaire.....	25
B. Croissance sur lait de Sherman.....	25
C. La thermorésistance.....	26
D. Tolérance au pH alcalin.....	26
E. Culture sur milieu hypersalé.....	26
F. Croissance à différentes températures.....	26
G. Recherche de l'arginine Di-hydrolase (ADH).....	27
H. Test de production d'acétoïne.....	27
I. Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose).....	27
J. L'utilisation des carbohydrates.....	28
IV.2.5. Conservation des souches	28
➤ Conservation courte durée.....	28
➤ Conservation longue durée.....	28

Chapitre V : Résultats et Interprétations :

1. Pré-identification des souches.....	29
1.1. Aspect macroscopique.....	29
1.1.1. Test de la catalase.....	30
1.2. Aspect microscopique.....	30
1.2.1. Examen à l'état frais.....	30
1.2.2. Examen après coloration de GRAM	31
2. Identification des souches.....	31
2.1. Type fermentaire.....	32

2.2. La croissance en conditions hostiles.....	33
2.3. Thermorésistance	34
2.4. Test de lait de Sherman.....	35
2.5. Hydrolyse de l'arginine.....	35
2.6. Production de l'acétoïne.....	36
2.7. Fermentation du citrate.....	37
2.8. Profil fermentaire.....	38
Discussion générale.....	41
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44
Annexe.....	56

Remerciement

Au terme de ce travail, je remercie avant tout, le bon dieu de m'avoir guidé tout au long de ma vie.

*Je voudrai remercier particulièrement mon promoteur **Mr. BEKADA Ahmed**, d'avoir accepté de m'encadrer, pour toute son aide, sa disponibilité, son suivi et sa confiance.*

*Je tiens à remercier le professeur **Mr. Homrani**, de m'avoir permis d'effectuer mon stage au laboratoire microbiologie de science et SNV de l'université Abdelhamid Ibn Badis, wilaya de Mostaganem.*

Je tiens à remercier également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de mon travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A toute ma famille en particulier, ma mère, mon père, mes frères : Mohamed, Yassine,
Mansour, et mes sœurs,*

A tous mes professeurs, en particulier, Mr BEKADA Ahmed M. A

A toutes mes amies, en particulier : Mlle HOUBAD Khadîdja

*En fin je dédie ce travail à toute la promotion 2^{ème} master d'Exploitation des Ecosystèmes
microbiens laitiers 2016.*

Zohra.

Résumé

Le lait de chamelle présente sans aucun doute un intérêt particulier pour les nomades et les populations du sud, car il est parfaitement conforme aux exigences de l'homme vu sa haute teneur en nutriments de base (protéines, lipides, lactose), en vitamine C et en niacine. Son système protecteur naturel puissant (lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine, immunoglobulines et protéose-peptones³) le distingue du lait bovin. Le lait de chamelle peut être consommé cru, pasteurisé ou fermenté.

Des bactéries lactiques ont été isolées à partir de laits crus de chamelle; elles comprenaient des coques lactiques parmi les coques lactiques résistantes, des isolats s'apparentant à des *lactocoques*.

Notre travail est débuté par l'isolement et la purification de 32 souches à partir de un seul échantillon de lait de chamelle cru. L'isolement s'est effectué sur milieu Elliker lactosé a obtenu des colonies blanchâtres ou crème, rondes lisses et de formes lenticulaires de petite taille. Après la purification des isolats ont subi une identification de 15 souches par l'utilisation des tests morphologiques, physiologique et biochimique, les tests effectués ont révélé d'identifier les espèces suivantes (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis biovar. diacetylactis* et *Lactococcus raffinolactis*).

Mots-clés : lait de cru de chamelle, *Lactococcus*, Elliker lactosé, immunoglobines, système protecteur.

Abstract

Camel milk is undoubtedly of particular interest to nomads and Populations of the south, because it is perfectly in line with the requirements of humans given its high Nutrients (proteins, lipids, lactose), vitamin C and niacin. Its powerful natural protective system (lysozyme, lactoperoxidase, lactoferrin, immunoglobulins and proteose-peptones³) distinguishes it from bovine milk. Camel milk can be eaten raw, pasteurized or fermented.

Lactic bacteria were isolated from camel raw milk; They included lactic shells among the resistant *lactic* shells, isolates resembling *lactococci*.

Our work is started by isolating and purifying 32 strains from a single sample of raw camel's milk. The isolation was performed on laliosedElliker medium obtained whitish or cream colonies, smooth round and small lenticular forms. After the purification of the isolates, 15 strains were identified by the use of morphological, physiological and biochemical tests, the tests revealed the following species (*Lactococcuslactissubsp.lactis*, *Lactococcuslactis subsp. Cremoris*, *LactococcuslactisLactisbiovar, diacetylactis* and *Lactococcusraffinolactis*).

Keywords: camel's milk, *Lactococcus*, Elliker lactose, immunoglobins, protective system.

ملخص

إن حليب الإبل يمثل بدون شك أهمية خاصة بالنسبة للبدو و سكان الجنوب، لأنه يتماشى تماما مع متطلبات الإنسان نظرا إلى محتواه العالي من الأغذية الأساسية (البروتينات، والدهون واللاكتوز)، وفيتامين: C والنياسين و نظامه الوقائي(الليزوزيم، لاکتوبيروكسيديز، اللاكتوفيرين، ايمينوغلوبولين، والبروتياز، بيتون 3) وهذا ما يميزه عن حليب البقر، حليب الإبل يمكن أن يستهلك طازجا، مبسترا أو مخمر تم عزل بكتيريا حمض اللاكتيك من حليب الإبل الطازج. المتمثل في اللاكتيكالمقوغة، ومن بينها اللاكتيكالمقوغةالمقاومة، تنتمي إلى سلالة *Lactocoques*

بدأ عملنا بعزل وتنقية 32 سلالات من عينة واحدة من حليب الإبل الطازج، العزل تم في الوسط *Elliker lactosé*

فحصلنا على مستعمرات بيضاء أو كريم، ملساء وأشكال مستديرة، عدسية صغيرة الحجم، بعد تنقية السلالات تم التعرف على 15 سلالة من خلال استخدام الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائية، وكشفت الاختبارات في التعرف على الأنواع التالية

(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* et *Lactococcus raffinolactis*).

الكلمات المفتاحية

Lactococcus، *Elliker lactosé*، حليب الإبل الطازج، نظام وقائي، ايمينوغلوبولين

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADH : Arginine Dihydrolase

sp. : Espèce non précisée

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ssp. : Sous espèce.

Amd : amidon

BAL, BL : Bactérie Lactique

CO₂ :dioxyde de carbone

C : cytosine

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

G : Guanine

g, mg, µg : Gramme, milligramme,
microgramme

L, ml : Litre, millilitre,

L(+) : produisant L'acide lactique

Lc. : *Lactococcus*

L. Lactis : *Lactococcus.Lactis*

Min, s, h, J : minute, seconde, heure, Jour

NaCl : Chlorure de sodium

pH : Potentiel d'Hydrogène

Km : Kilomètre

KMK :Kempler Mc Kay

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : échantillon de lait cru de chamelle collecté.....	23
Figure 2 : préparation des déluions décimales à partir de lait cru de chamelle.....	23
Figure 3: les boites isolées sur milieu solide Ellikerlactosé agar par la méthode de strie.....	24
Figure 4: colonies développées issues du lait de chamelle ensemencé sur milieu Ellikerlactosé.....	29
Figure 5 : Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide ELLIKER lactosé.....	30
Figure 6 : Aspect macroscopique d'une culture pure dans un milieu solide ELLIKER lactosé.....	30
Figure 7 : Représente l'observation microscopique de Lactocoque après coloration de GRAM (Gx 100).....	31
Figure 8 : Résultat de type fermentaire des isolats.....	33
Figure 9: Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (4% NaCl).....	33
Figure 10 : Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (6,5% NaCl).....	34
Figure 11 : Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.	34
Figure 12 : Résultat de la croissance des isolats à pH 4.	34
Figure 13: Résultat d test de lait de Sherman.....	35
Figure 14 : La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).....	36
Figure 15 : Test de la production d'acétoïne.....	37
Figure 16 : Test de réduction de citrate sur milieu KMK.....	38
Figure 17 : Le profil fermentaires des isolats effectué sur plaque d'Elisa.....	40
Figure 18 : Distribution des espèces de <i>lactococcus</i> selon le nombre des souches.....	40

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle.....	4
Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....	13
Tableau 3: Im	
portance des minéraux dans le métabolisme des lactocoques.....	18
Tableau 4 : Production de diacétyl et d'acétaldéhyde par les <i>lactocoques</i>	19
Tableau 5: résultats des tests physiologiques.....	32
Tableau 6: Profile fermentaires des souches isolées.....	39

Introduction

Introduction

Le lait est produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères. Il est destiné à l'alimentation des nourrissons. Il est riche en protéines et en glucides. De nombreux produits laitiers sont fabriqués à partir du lait. **(Vilain. A.-C. 2010)**

Le lait de chamelle, comme celui des autres mammifères, est un milieu de composition chimique et physique complexe, permettant au chamelon de couvrir ses besoins énergétiques et nutritionnels pendant la première étape de son existence **(KAMOUN et RAMET, 1989)**.

C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Des travaux de certains auteurs ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème **(De Roissart et Luquet, 1994)**.

Les *lactocoques* sont généralement associés à une forte capacité d'acidification du lait. Elles présentent aussi des propriétés inhibitrices envers la flore d'altération et envers la flore pathogène du fromage, grâce à la production de métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines ou à sa compétition écologique vis-à-vis des nutriments **(DORTU et THONART, 2008 ; O'SULLIVAN et ROSS., 2002)**.

Notre travail, s'inscrit dans ce cadre précis et consiste en une contribution à la connaissance du lait camelin par l'étude de :

Sélection d'une souche acidifiante à partir des échantillons de lait camelin cru.

Pour mieux cerner l'objectif dans lequel s'inscrit ce sujet de mémoire, nous avons subdivisé notre travail en 4 chapitres principaux :

- Le premier chapitre fait référence à une bibliographie faisant le point sur le lait de chamelle, dromadaire, les bactéries lactiques et le genre *Lactococcus*.
- Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes d'échantillonnage, mise en évidence d'un milieu de culture spécifique pour l'isolement du genre *Lactococcus*.

▪ Dans le troisième chapitre nous faisons état des résultats obtenus et leurs interprétations. Une discussion générale est suivie d'une conclusion. Enfin, nous avons indexé au présent travail des références bibliographiques et des annexes.

Chapitre I

Lait De Chamelle

I- Le lait :

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le Congrès international de la répression des fraudes comme suit :

« Le lait est produit intégral de la traite et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée .Il doit recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**larpant, 1997**).

Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite. Le lait cru doit être porté à ébullition avant consommation. Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24H (**FREDOT, 2006**).

I-1-Les différents laits:

Un homme, avant de partir en voyage, avait creusé quatre trous dans le sol. : Il avait rempli le premier de lait de chèvre, le second de lait de brebis, le troisième de lait de vache et le dernier de lait de chamelle. Un an plus tard, à son retour, il trouva le lait de chèvre transformé en poils, le lait de brebis en pus, celui de vache en vers ; seul le lait de chamelle était resté intact. Cette histoire montre que le lait de chamelle est le plus apprécié : léger, mousseux, légèrement salé, il ne communique aucune maladie. Supérieur à tous les autres, il possède toutes les vertus. Bien entendu. (**Gast, 1968**).

I-1-1-Le lait de chamelle :

Le lait de chamelle caractérisé par sa richesse en lysozyme et en vitamine C, est naturellement protégé contre les attaques extérieures. En plus, le milieu naturel du dromadaire, caractérisé par de fortes insulations, des températures élevées et de faibles humidités relatives, limite le développement des microorganismes (**SAIDI M et al., 1999**).

Le lait camelin a un rôle important pour la nutrition humaine dans les zones arides et semi-arides. Il renferme tous les nutriments essentiels qu'on trouve dans le lait bovin, en quantités équilibrées (**EL-AGAMY et al, 1998; KARUE, 1998**).

I-1-2- Caractéristiques organoleptiques et physico-chimique du lait camelin :

Le lait camelin, à l'observation visuelle est de couleur blanche. A la traite et lors des transvasements, il forme une mousse abondante à cause de sa teneur élevée en composant-3-

des protéose- peptones (PP3) par rapport au lait bovin (1.1 contre 0.3 g/l respectivement) (SMAIL, 2002).

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

Ce lait présente une composition physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin. Il se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en lysozyme, en lactoperoxydase, en lactoferrine et en bactériocines produites par des bactéries lactiques. (SIBOUKEUR A et SIBOUKEUR, 2012).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle (FAYE, 1997).

Caractéristiques	Moyenne	Maximum	Minimum
pH	6,56	6,8	6,2
Densité spécifique	1,035	1,038	1,025
Point de congélation	-0,58° C	-0,60°C	-0,55°C
Teneur en eau	87,90%	90%	84,80%
Extrait sec total	12,10%	15,20%	10,00%
Taux de matières grasses	3,80%	5,60%	2,50%
extrait sec dégraissé	8,20%	10,30%	6,20%
Teneur azotée totale:	3,50%	5,50%	2,20%
dont caséines	2,60	4,10	1,50
dont alb.et glob.	0,90	1,40	0,50
Teneur en lactose	3,90%	5,10%	2,60%
Teneur en Cl	0,16%	0,17%	0,14%
Teneur en cendres	0,76%	0,90%	0,60%

I-1-3-Microbiologie du lait camelin:

La qualité d'un aliment n'est pas uniquement définie par les différentes teneurs en nutriments qu'il contient, ni par sa composition en matières premières ou sa digestibilité et son appétence, ni même par son apparence ou ses caractéristiques sensorielles, mais aussi et surtout par son état hygiénique (**GAFNER, 2012**).

Le lait est un substrat renfermant des concentrations satisfaisantes en protéines, en glucides, en lipides, en sels minéraux et en vitamines nécessaires à 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**).

I-1-4- Propriété médicinale :

Le lait de chamelle est supposé porteur de vertus diététiques et thérapeutiques qui en font un produit de qualité. En effet, traditionnellement, des propriétés antibiotiques, anti-infectieuses, anti-cancéreuses, antidiabétiques, des effets prophylactiques et reconstituants chez les malades en convalescence sont attribués au lait de chamelle. Au Kazakhstan, le lait de chamelle fermenté (shubat) est utilisé pour le traitement de la tuberculose, de la gastroentérite, des ulcères gastriques et pour l'alimentation des nourrissons (**Konuspayeva et al., 2004**).

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

I-1-5-Propriété technologique et produits fermentés :

Le lait de chamelle ne peut pas être transformé en yoghourt, fromage et beurre par l'application des diagrammes technologiques classiques. Les difficultés de transformation de ce lait seraient contournables par des adaptations technologiques couramment utilisées en industrie laitière pour corriger les laits (**Kamoun., 1995**).

Certain fromages traditionnels de lait camelin sont fabriqués chez les nomades localisés à l'Ahaggar ainsi qu'à la péninsule du Sinaï, en Tunisie et au Kenya (**YAGIL et al, 1994**). Ces

fromages sont élaborés par thermo-coagulation des protéines et obtention d'une pâte humide en forme de galette à consommer rapidement ou après séchage naturel et/ou salage (**GAST *et al*, 1969 ; YAGIL, 1982 ; MOHAMED *et al*, 1990**).

I-2- Généralités sur le dromadaire :

Le nom « dromadaire » dérive du terme grecque « dromados » qui veut dire course. Il est donné à l'espèce de chameau à une seule bosse, appartenant au genre *Camelus* de la famille des *Camélidés* et dont le nom scientifique est *Camelus dromedarius* (**ZEUNER, 1963**).

Le chameau est historiquement connu pour être le compagnon de l'Homme dans les environnements désertiques sévères. Avec ses caractéristiques anatomiques et physiologiques particulières, il permet la conversion de la matière végétale en travail, en lait et en viande dans les régions arides chaudes (**YAGIL et ETZION, 1980 ; KARRAY *et al*, 2004**).

Le lait de chamelle constitue la principale ressource alimentaire pour les éleveurs de dromadaires au Sahara, il ne semble pas différent de celui des autres animaux domestiques et constitue un très bon apport en minéraux pour le chameau et le consommateur (**BENGOUMI, 1998**).

I-2-1-Classification :

Le dromadaire appartient à l'embranchement des vertébrés, classe des mammifères ongulés et sous classe des placentaires. Il appartient à l'ordre des Artiodactyles, sous-ordre des Tylopodes (**PRAT, 1993 ; KHAN *et al*, 2003; CORREA, 2006**) et à la famille des camélidés. La famille des camélidés ne comprend que deux genres : *Camelus* et *Lama*. Le genre *Camelus* occupe les régions désertiques de l'Ancien Monde (Afrique, Asie et Europe) alors que le genre *Lama* est spécifique des déserts d'altitude du Nouveau Monde (les Amériques) où il a donné naissance à quatre espèces distinctes.

Genre *Camelus*

Camelus dromedarius (dromadaire, avec une seule bosse)

Camelus bactrianus (chameau de Bactriane, avec deux bosses)

Genre *Lama* (les espèces de ce genre sont toutes sans bosse)

Lama glama (lama).

Lama guanacoe (guanaco).

Lama pacos (alpaga ou alpaca).

Lama vicugna (vigogne) (SKIDMORE, 2005 ; OULD AHMED, 2009).

I-2-2-Production laitière :

La production mondiale de lait de chamelle est estimée officiellement à 1,3 millions de tonnes en 2002. Cependant, si on tient compte de l'autoconsommation et du réel potentiel moyen des animaux en production, il est probable que cette production soit plus élevée (soit 5,4 millions de tonnes). Les productions individuelles varient entre 1000 et 2700 litres par lactation en Afrique, mais peuvent atteindre 7000 à 12 000 litres selon certaines sources en Asie du Sud. Actuellement, la production nationale globale de lait camelin en algérie se situe entre 2,5 milliards à 3 milliards de litres en 2015. (<http://almanach-dz.com/index.php?op=fiche&fiche=49>).

I-2-3-Les facteurs influençant la production laitière :

La variabilité des rendements laitiers observés est liée à divers facteurs dont:

➤ **Type d'alimentation :**

Comme pour le bovin, l'alimentation du dromadaire reste le facteur le plus déterminant (RAMET, 1993 ; MEHAIA *et al*, 1995 ; WANGOH *et al*, 1998). En effet, selon plusieurs auteurs (KNOESS *et al*, 1986 ; RICHARD et GERARD, 1989) l'amélioration des conditions alimentaires (régimes riches en fourrages verts renfermant de la luzerne, du mélilot ou du chou) prolonge la période de lactation et augmente la quantité de lait produite jusqu'à atteindre parfois le double. Par ailleurs, la disponibilité ou non de l'eau n'influence presque pas cette production qui n'est que faiblement diminuée en période de sécheresse. Une privation d'eau de 7 jours reste sans effet sur le niveau de production du lait (YAGIL et ETZION, 1980 ; YAGIL, 1982 ; FARAH, 1993 ; YAGIL *et al*, 1994).

➤ **Rang et stade de lactation :**

Une fluctuation de la production laitière est observée entre le début et la fin de la lactation. La plus grande partie du lait est produite durant les sept premiers mois (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; RICHARD et GERARD, 1989).

➤ **La pratique de traite :**

Généralement, le chamelon est mis à téter pendant quelques minutes en début de traite pour favoriser la montée du lait, puis il est écarté pour la suite de la traite qui est faite manuellement. Une traite conduite sans stimulation mécanique préalable donne des rendements inférieurs en lait. La traite doit être exécutée par une personne acceptée par le dromadaire, le changement du trayeur habituel entraîne très souvent une importante rétention lactée (**RAMET, 1993**).

➤ **La race :**

Concernant l'effet de race, il est rapporté une production annuelle moyenne 2,6 fois plus élevée chez les races asiatiques que chez celles provenant du continent africain (**RAMET, 1993**).

➤ **Conditions climatiques:**

La variabilité saisonnière du disponible fourrager, associée aux facteurs strictement climatiques (chaleur, aridité), joue évidemment sur les performances laitières de la chamelle. La différence selon la saison de mise bas des jeunes (élément essentiel pour déclencher la production) peut jouer sur plus de 50 pour cent de la production : les performances laitières sont plus faibles en fin de saison sèche qu'en saison des pluies (**FAYE, 2004**).

➤ **Statut sanitaire :**

La plupart des troubles parasitaires (trypanosomiase, parasitisme gastro-intestinal, parasitisme externe) interfèrent avec la production. En milieu pastoral, l'utilisation d'intrants vétérinaires classiques destinés à la prévention contre les maladies parasitaires permet d'augmenter la production laitière des chamelles de plus de 65 pour cent (**FAYE, 2004**).

I-2-4-Importance du dromadaire :

Le dromadaire joue un rôle socio-économique primordial dans les sociétés pastorales nomades, dont il fournit des ressources alimentaires appréciables par sa viande, sa graisse, son

lait. Ses urines ont un rôle thérapeutique en servant au traitement de certaines maladies. Sa peau, sa laine constituent des matières premières pour l'artisanat. Avec les excréments du dromadaire, les pasteurs font du feu et/ou préparent des pansements. Ces excréments constituent également des fertilisants naturels pour les parcours pastoraux (**Cottin, 2000 ; Diallo, 1989 ; Lhote, 1987**).

I-2-4-A- Le dromadaire ; animal de transport :

Le dromadaire est fréquemment utilisé comme animal de bât, il reste dans certaines régions le moyen de transport des personnes et de marchandises, incontestablement, le plus économique à l'échelle de la famille et de la tribu (**LASNAMI, 1986**).

Le dressage pour le transport commence en général à l'âge de quatre ans, l'animal porterait une pleine charge vers huit ans, la vie de porteur serait en moyenne de douze ans (**LASNAMI, 1986**).

I-2-4-B- Le dromadaire ; animal de selle :

L'utilisation de dromadaire comme animal de selle, est encore largement pratiqué là où n'existent pas d'infrastructures routières. On peut toutefois considérer qu'un dromadaire de selle peut parcourir 50 à 100 Km/j, à une vitesse moyenne de 10 à 12 Km/h (**LEOPOLD, 1968**),

I-2-4-C- Le dromadaire, animal de traction :

Le dromadaire n'est utilisé comme animal de traction qu'en Afrique du Nord et surtout en Pakistan et en Inde. Dans ce derniers pays, il est incontestable que l'emploi massif du dromadaire comme animal de trait représente un puissant levier de développement agricole dans une perspective durable (énergie non polluante, économique et autonome) (**FAYE, 1997**).

I-2-5-Les races algériennes :

Les différentes races rencontrées en Algérie se retrouvent dans les trois pays d'Afrique du Nord; ce sont des races de selle, de bât et de trait. Il s'agit des races suivantes: Le Chaambi

L'Ouled Sidi Cheikh, le Saharaoui, l'Ait Khebbach, le Chameau de la Steppe, le Targui ou race des Touaregs du Nord, L'Aier, le Reguibi et le Chameau de l'Aftouh (**Balla, 2011**).

➤ **CHAAMBI :**

Sa répartition va du Grand Erg Occidental au Grand Erg Oriental sur bande qui s'étend du Nord au Sud du chott El Honda jusque dans le Metlili des chaâmba dans la vallée du M'zab, et jusqu'au Nord d'Adrar et de Béni Abbés. Cela dit, c'est une race que l'on peut rencontrer dans toutes les régions à vocation cameline. (**MESSAOUDI, 1999**).

➤ **L'Ouled Sidi Cheikh:**

C'est un animal de selle. On le trouve dans les hauts plateaux du grand ERG Occidental (**BEN –AISSA M, 1989**).

➤ **Le Saharaoui:**

Est issu du croisement Chaambi et Ouled Sidi Cheikh. C'est un excellent méhari. Son territoire va du grand ERG Occidental au Centre du Sahara (**BEN –AISSA, 1989**).

➤ **L'Ait Khebbach**

Est un animal de bât. On le trouve dans l'aire Sud-ouest (**BEN –AISSA, 1989**).

➤ **Le Chameau de la Steppe:**

Il est utilisé pour le nomadisme rapproché. On le trouve aux limites Sud de la steppe (**BEN –AISSA, 1989**).

➤ **Le Targui ou race des Touaregs du Nord :**

C'est le dromadaire de course par excellence, il est très haut sur des membres fins et secs, avec une robe grise à poils très courts et fins. C'est le dromadaire des Touaregs du Nord, on le retrouve dans le Sahara central, le Hoggar et l'extrême Sud Algérien (Tamanrasset). On le rencontre très souvent un peu plus au Nord, parce qu'il est très souvent utilisé comme reproducteur et, bien entendu, pour les courses des dromadaires (**MESSAOUDI, 1999**).

➤ **l'AJJER :**

C'est un dromadaire de selle, mais il est plus souvent utilisé comme porteur. On le rencontre dans la région du Tassili, mais aussi dans le Sud des Wilayas de Tébessa, d'El-Oued et de Biskra (**MESSAOUDI, 1999**).

➤ **Le Reguibi:**

C'est un dromadaire de taille moyenne à la robe cendrée avec toutes les nuances du clair au foncé, il est indifféremment utilisé pour le transport ou pour le selle. On le rencontre dans le Sud-Ouest Algérien, dans la région du Béchar, Tindouf et jusqu'à la région d'Adrar (**MESSAOUDI, 1999**).

➤ **Le Chameau de l'Aftouh :**

Utilisé comme animal de trait et de bât. On le trouve aussi dans la région des Reguibet (Tindouf, Bechar) (**BEN –AISSA M, 1989**).

Chapitre II

Les Bactéries Lactiques

II-Bactéries lactiques :

II -1. Définition et caractéristiques principales :

Les bactéries lactiques appelées aussi bactéries de l'acide lactique (BAL) constituent un groupe très hétérogène de micro-organismes partageant divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologies, et dont la caractéristique fondamentale est la production de quantités appréciables de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme fermentaire (**Marshall et al., 1984 ; Axelsson, 1993**). Les (BAL) sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophe. Elles sont Gram positive, généralement immobile, asporulées, anaérobie, mais aérotoleérantes (microaérophiles). Elles sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et la cytochrome oxydase, aussi elles ne produisent pas d'indole ni acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine. En raison de leur faible capacité biosynthétique, ces bactéries 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**).

II -2. Habitat :

La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries ont colonisé d'autres environnements et se trouvent ainsi dans divers habitats, tant que ceux-ci réunissent les conditions adéquates pour satisfaire leurs besoins nutritifs (**Fenton, 1987 ; Kelly et al., 1998 ; Carr et al., 2002**). De cette manière, le lait, auquel les BAL peuvent accéder à travers le corps de l'animal, les excréments ou les végétaux, est devenu un habitat caractéristique des bactéries lactiques, et ainsi elles se trouvent associées à divers produits laitiers fermentés (**Dellaglio et al., 1994**). Il faut signaler, en outre, que les BAL font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux animaux homéothermes (**Holzappel et al., 1998 ; Sookkhee et al., 2001**).

II-3. Taxonomie et classification :

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**De Roissart et Luquet, 1994; Holzappel et al., 2001**).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme et al, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007**).

Tableau 02 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (**Laurent et al., 1998**).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou heterofermentaires	thermophiles ou mésophiles
<i>Lactococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles
<i>Streptococcus</i>	Coques	homofermentaires	mésophiles ou thermophiles
<i>Leuconostoc</i>	Coques	heterofermentaires	Mésophiles
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	acide acétique et lactique	Mésophiles

II-4-Exigences nutritionnelles :

Les B.L ont un besoin pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre des éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, par ce qu'elles ont une faible biosynthèse donc ce sont auxotrophes. Alors elles sont considérées comme un groupe de bactéries le plus exigeant de point de vie nutritionnel (**Dridier et Prevost, 2009**).

II-4-1-Exigences en acides aminés :

Les bactéries lactiques sont en principes incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés,

et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (Luquet, 1986).

II-4-2-Exigences en bases azotées :

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1983).

II-4-3-Exigences en sels minéraux :

Les principaux éléments tel que le magnésium et le manganèse sont généralement requis (Imbert et Blandeau, 1998; Letrot et Juillard, 2001; Corrieu et al., 2008) jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (Ledesma et al., 1977; Mazali, 1992), alors que les besoins en calcium et en potassium sont moins systématiques. Les besoins en fer dépendant des micro-organismes (Pandey et al., 1994; Imbert et Blandeau, 1998). Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à fort concentration. A l'opposé, le sodium, le cadmium, et le cuivre démontrent un effet inhibiteur (Corrieu et al., 2008).

II-4-4-Exigences en cations :

Le rôle principal des cations dans la nutrition des bactéries lactiques et dans les différentes réactions métaboliques (Boyaval et al., 1988)

II-4-5-Exigences en vitamines :

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable des coenzymes dans le métabolisme cellulaire. *Streptococcus thermophiles* a une exigence absolue en acide pantothénique (B5), en riboflavine (B2), à moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8). La pyridoxine ou ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance (Desmazeaud, 1983).

II-4-6-Exigences en glucides :

Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter des glucides. (Wood et Holzappel, 1995 ; Bazo, 2011), par exemple *S. thermophilus* est fermenté et transformé rapidement du lactose en lactate, et utilisé différent source tel que : lactose, saccharose, glucose, galactose, fructose. *S. thermophilus* a été adapté à alimenter et croître sur lactose comme source de carbone (Vaillancourt et al., 2002 ; Vanden Bogaard et al., 2004 ; Ben-Yahia, 2012).

II-5-Importance industrielle des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Ils fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bio conservation des denrées alimentaires (*Carmen et al., 2000*). Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des bactéries lactiques, elles avaient été utilisées dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (*Paul rosse et al., 2002*).

II-6-Les rôles bénéfiques sur la santé :

Les effets bénéfiques des bactéries lactiques pour la santé des consommateurs sont reconnus depuis longtemps. Le zoologiste microbiologiste Ukrainien Ilia Ilitch (1845-1916) a mis en rapport la longévité de certains peuples, dont les Bulgares et la protection de l'organisme contre plusieurs maladies par consommation de laits fermentés et ainsi l'ingestion de grandes quantités de bactéries lactiques. Pour que les bactéries lactiques puissent avoir un rôle bénéfique sur la santé humaine, il faut qu'elles gardent une certaine activité, voire une viabilité lors du transit intestinal. Ainsi, les bactéries elles-mêmes ou les enzymes doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires (*SAVADOGO et TRAORE, 2011*).

Chapitre III

Le genre *Lactococcus*

III-Le genre *Lactococcus* :

III-1-Historique :

Les *lactocoques* ont une longue histoire d'utilisation dans les fermentations du lait, des petites opérations traditionnelles dans la ferme ou la maison familiale à des processus à l'échelle industrielle. Il en découle un besoin de pratiques de fabrication plus robustes, plus efficaces et plus affinées qui a conduit à une augmentation des recherches fondamentales et appliquées sur les espèces bactériennes impliquées, en l'occurrence *Lactococcus lactis*. D'énormes progrès ont été accomplis dans le décryptage de la génétique et la biologie moléculaire de ces microorganismes économiquement très importants. De nombreux outils et techniques ont été développés pour disséquer génétiquement *L. lactis*, tel que les méthodes des plasmides vecteurs de clonage et de transformation, les vecteurs de différents gènes (inductibles) d'expression et des méthodes pour introduire des mutations dans des régions déterminées du génome de *L. lactis*. Ainsi, cet organisme est devenu le paradigme des bactéries lactiques (LAB) et la deuxième bactérie à Gram positif la mieux étudiée après *Bacillus subtilis*. L'augmentation de la connaissance de la génétique, de la physiologie et de la biologie moléculaire de *L. lactis* a permis une profonde compréhension des traits qui sont d'une importance capitale pour les processus industriels dans lesquels l'organisme est utilisé (A. SAVADOGO et A. S. TRAORE., 2011).

III-2-Définition:

Les *lactocoques* sont des bactéries appartenant à la famille des *streptococaceae*, elles se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), elles sont mésophiles puisque leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se croître à 10°C mais pas à 45°C. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

III-3-Habitat :

Les habitats les plus importants des lactocoques demeurent le lait, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, on peut également les isoler des plantes (Sandine et coll., 1972). Les lactocoques peuvent être isolés du lait ou des végétaux qui sont probablement leur réservoir naturel. Ces bactéries ne se trouvent pas dans les selles ni dans le sol (Novel, 1993).

III-4-Taxonomie :

Schleifier et al. (1985) ont proposé de séparer les *lactocoques* du genre *streptococcus* et de créer le genre « *Lactococcus* » **dupuy, (2004)**. Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces : *L. garviae*, *L.piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactics* et *L. lactics*, *L.chungangens*. Cette dernière espèce est divisée en trois sous-espèces :

Lc. lactis ssp. lactis ;

Lc. lactis ssp. cremoris ;

Lc. lactis ssp. hordniae (**TORMO, 2010**).

Lactococcus lactis ssp. lactis

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Lactobacillales

Famille : Streptococcaceae

Genre : *Lactococcus*

Espèce : *Lactococcus lactis*

Sous espèce : *Lactococcus lactis ssp. lactis* (**De Vos et al., 2009**)

III-5-Les besoins nutritionnels:

Comme toutes les bactéries lactiques, les lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique, ce qui explique leurs exigences du point de vue nutritionnel. Ils utilisent pour leur croissance des éléments complexes carbonés, azotés et phosphatés, ainsi que des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (**Konnings, 1994**).

Tableau 3: Importance des minéraux dans le métabolisme des lactocoques (Leveau et Bouix., 1993).

Minéral	Importance
Le magnésium	Améliore l'activité des protéases par son rôle dans la paroi cellulaire
Le potassium	La régulation du PH intracellulaire
Le cuivre	Augmente la production de diacétyle

III-6-Rôle des *lactocoques* :

Parmi les rôles utiles des *Lactocoques* nous pouvons citer :

➤ **Production d'acide lactique:**

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Schmidt *et al.*, 1994). En pratique, il convient de prendre en considération deux aspects de la production d'acide lactique : la vitesse d'acidification (dépend de la composition du milieu et de la température d'incubation) et le niveau maximal de production. Avec les lactocoques, l'acidité maximale correspond à un pH de 4,5 (Antoine *et al.*, 1993).

➤ **Production d'arômes :**

Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconservation optimale, d'un arôme et d'une texture caractéristique des produits alimentaires fermentés. Ainsi *Lactococcus lactics ssp. diacetylactics* est considérée comme principal fournisseur de diacétyle et d'acétaldéhyde à partir des citrates (Doleyres, 2003).

Tableau 4 : Production de diacétyl et d'acétaldéhyde par les *lactocoques* (Novel et lequerler, 1995).

Souches	Diacetyl (µg/ml)	Acétaldéhyde (µg/ml)
<i>Lc.Lactics subsp. Lactics</i> <i>biovar diacetylactis</i>	0,60-55,0	2,2-11,3
<i>Lc.Lactics subsp. lactics</i>	0,05-0,10	0,7-2,3
<i>Lc.Lactis subsp. cremoris</i>	0,05-2,30	0,3-3,7

➤ **Production de bactériocine :**

Le genre *Lactococcus* joue un rôle de conservateur dans le lait. En effet, les espèces telles que *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* produisent respectivement de la « nisine » et la « diplococcine », bactériocines, inhibant les bactéries non lactiques au profit des bactéries lactiques d'où leur intérêt technologique (GREAUME, 1975).

➤ **Production d'agents épaississants :**

Le pouvoir épaississant ou filant dans les produits fermentés est exercé par les bactéries lactiques indépendamment du pouvoir acidifiant de ces souches, cette production d'agents épaississants leur confère des caractéristiques rhéologiques particuliers (Girrafa et Bergere, 1987). Certaines souches de *Lc. Lactis subsp. Cremoris* peuvent produire un exopolysaccharide qui assure l'augmentation de la viscosité, dont le déterminant génétique est un plasmide instable. Cette propriété semble accroître la résistance des souches aux phages (Harteley et al., 1989).

➤ **Activité protéolytique :**

En plus de son action sur la coagulation du lait lors de la croissance des bactéries lactiques, la protéolyse d'origine bactérienne est essentielle à l'affinage des fromages par le développement des saveurs et de la texture (Law, 1984). Contrairement à *Lc.*

Lactis subsp. Cremoris qui dégrade toutes les protéines du lait, la majorité des souches de l'espèce *Lc.Lactis subsp .lactis* assimilent essentiellement la caséine β et pas les caséines α et k (Aubert, 1998).

➤ **Activité lipolytique :**

Chez *Lc.Lactis subsp .lactis* et son biovar *diacetylactis*, l'activité lipolytique et l'activité estérasique sont à la fois cytoplasmiques et membranaires. Ces activités augmentent en phase exponentielle de la croissance (Novel, 1993).

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

Objectif de travail :

L'objectif de cette étude vise à isoler, purifier et identifier des lactocoques à partir de lait cru de chamelle.

IV-Matériels et Méthodes

IV-1-Matériels utilisés :

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant:

IV-1-1-Les échantillons étudiés :

Le lait utilisé dans la présente étude c'est le lait cru de chamelle, Il a été prélevé à partir du mois de Mars 2017, à partir de troupeaux de chameaux dans la région de Khayter « Bogtob-El-bayadh » de la race Sahraoui.

IV-1-2- Les milieux de culture utilisés :

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- **Géloses :**

ELLIKER lactosé agar, M16BCP, KMK.

- **Bouillons :**

Elliker lactosé liquide, eau physiologique, Bouillon hypersalé 4% 6,5%.

- **Autre milieux :**

Lait écrémé, Clark et Lubs, lait de Sherman à 0,1% à 0,3% de bleu de méthylène, MRSBCP.

IV-1.3. Produits chimiques et réactifs:

Les colorants:

Fuschine, cristal violet, bleu de méthylène.

Les acides et les bases :

NaOH, HCl

Les réactifs :

réactifs de Vogues Proskauer (VPI et VPII).

Alcool et autres :

Ethanol, lugol, eau oxygénée, citrate ferrique, ferricyanure de potassium, sucres (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, raffinose, lactose, sorbitol, mannose, l'amidon, esculine, rhamnose, maltose.)

IV-1.4. Appareillage :

Bec Bunsen ;

Microscope optique;

Bain Marie ;

Vortex électrique ;

Autoclave ;

Agitateur ;

Etuve ;

Bain-marie ;

Compteur de colonies ;

Réfrigérateur ;

Balance de paillasse ;

Micropipettes.

Verrerie et petit matériel :

Pipettes Pasteur, flacons en verre, tubes à essais en verre, pipettes graduées (1ml, 0,1ml) boites de pétri, béchers, anse de platine, Baro.

IV-2- Méthodes d'analyses :

IV-2-1- Technique d'isolement :

Le principe de l'isolement en microbiologie consiste à séparer différents micro- organismes d'un mélange et pour obtenir une ou plusieurs souches dans ce mélange.

- La solution mère a été préparée en prélevant 1 ml lait cru de chamelle qui a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile (**voir annexe I**). A partir de cette solution mère, des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-6} ont été effectuées (**figure 1,2**).

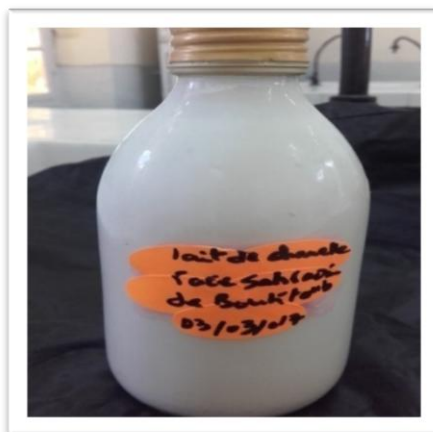


Figure 1 : échantillon de lait cru de chamelle collecté.



Figure 2 : préparation des déluions décimales à partir de lait cru de chamelle

- Les boîtes de Pétri vide sontensemencées en profondeur, un volume de 1 ml à partir des dilutions décimales allant de 10^{-4} à 10^{-6} . Compléter ensuite avec le milieu ELLIKER lactosé agar. Faire ensuite des mouvements sous forme de 8 et laisser solidifier sur pailleasse.

Incubation :

L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24-48 heures.

IV-2-2-Techniques de purification :

- La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon ELLIKER lactosé par l'utilisation des boites précédentes.

- Après sur milieu gélosé ELLIKER lactosé agar, se fait la méthode des stries, jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

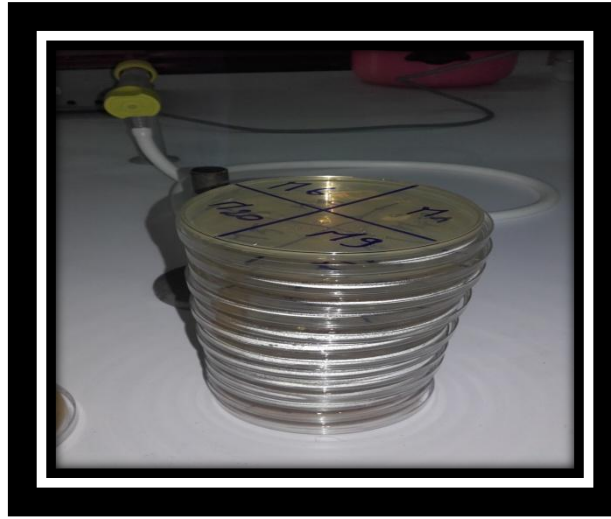


Figure 3: les boites isolées sur milieu solide Elliker lactosé agar par la méthode de strie.

IV-2-3-Pré- identification des isolats :

IV-2-3-A-Observation macroscopique :

Les colonies obtenus après purification sont ensuite observés à l'œil nu afin de déterminer leurs caractères morphologiques : l'aspect, La couleur, la taille, l'opacité, la texture, le contour, reliefs.

IV-2-3-B- Test de la catalase :

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+).

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Guiraud, 2003**).

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



IV-2-3-C-Observation microscopique :

Cela concerne l'observation microscopique des colonies à l'état frais et après la coloration de Gram (**Iarpent *et al.*, 1990**).

➤ **Examen à l'état frais :**

Cette méthode est très simple (**voir annexe III**), ne produit aucune déformation des sujets examinés, permet d'observer avec une parfaite exactitude la forme et les mouvements des microorganismes (**PETRANXIÉNE, 1981**).

➤ **Coloration de Gram :**

La coloration de Gram, développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement utilisée en bactériologie (**voir annexe III**). Ce procédé de coloration divise les bactéries en deux classes : Gram- négative (Gram), et Gram positive (Gram+) (**PRESCOTT *et al.*, 2003**), les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement, et de vérifier la pureté de la bactérie.

IV-2-4- Tests physiologiques et biochimiques :

A-Type fermentaire :

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par le lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence la fermentation de gaz (CO₂). C'est ainsi qu'on peut classer les bactéries lactiques en homo ou hétéro-fermentaires.

Les souches sont cultivées dans des tubes contenant Elliker liquide avec une cloche de Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 30°. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ a proportions égales (**Carr *et al.*, 2002**).

B-Croissance sur lait de Sherman :

Les isolats purifiés sur milieu Elliker liquide (**voir annexe I**), sont ensemencés dans deux séries de tubes deux série de tubes à essais de 9ml de lait écrémé stérilisé (**voir annexe I**) additionné à 0,1% de bleu de méthylène pour la première série et à 0,3% de bleu de

méthylène pour la deuxième série, estensemencé par des cultures pures puis incubés durant une période de 24 à 48 heures à 30°C.

Les *lactocoques* réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les *streptocoques thermophiles* sont sensibles à ce colorant (**Larpent et al., 1990**).

C- La thermorésistance :

Ce test permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les tubes de milieu Elliker. Sont exposés à un chauffage du bouillonensemencé par une culture jeune à une température 60°C pendant 30min.

A partir de chaque tube traité on aensemencé un nouveau tube de milieu Elliker et porté à incubation à 28°C pendant 48H. Les isolats qui ont poussé après ce traitement sont considéré comme thermorésistants (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

D. Tolérance au pH alcalin :

Ce test est réalisé uniquement pour les cocci en milieux Elliker liquide dont le pH est ajusté à 9,6

La croissance en milieu alcalin permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*.

E. Culture sur milieu hypersalé :

La croissance des souches à été testée à différents concentration de chlorure de soduim (NaCl). Ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl (**voir annexe I**), en les incubant à 30° pendant 48 H. Ce test permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (**Stiles et Holzapfel, 1997**). La présence du trouble indique la croissance des bactéries lactique en comparaison avec un tube témoin nonensemencé.

F-Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer Les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Les isolats ont étéensemencés dans le milieu Elliker liquide (**voir annexe I**), puis les tubes ont été incubés à différentes températures à 10°C, 40°C et 45°C pendant 24H à 48H.

Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (**Idoui et al., 2009**).

G-Recherche de l'arginine Di-hydrolase (ADH) :

Cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Le rôle de cette enzyme libère l'ammoniac à partir de l'arginine. Le test consiste en un ensemencement de la souche sur un milieu M16BCP solide à PH 7 (**Thomas., 1973**). Ce milieu contient du lactose (pas plus de 2mg/ml), de l'arginine (4mg /ml) et du pourpre de bromocrésol (0,05mg/ml) (**voir annexe I**), ensuite, une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du lactose. La dégradation de l'arginine et l'aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet.

H-Test de production d'acétoïne :

La production d'acétoïne est testée sur nos souches qui ensemencer sur milieu **Clack et Lubs (voir annexe I)**, Après l'ensemencement de souches pures dans 10 ml de ce milieu et après une incubation à 45C° pendant 24 à 48h, on ajoute 5 gouttes du réactif VPI puis 5 gouttes du réactif VPII (**voir annexe II**).

On agite soigneusement les tubes et on laisse pendant 5 à 10min à température ambiante. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à rouge à la surface du tube.

I-Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose):

Le métabolisme de citrate est connu depuis longtemps chez les *Lactococcus. lactis.subsp.lactis biovare diacetylactis* et c'est sa capacité à fermenté le citrate.

Sur milieu **KMK (1980) (voir annexI)** qui est utilisé pour savoir le pouvoir des bactéries de dégrader le citrate, Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation a 30C°). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

J-L'utilisation des carbohydrates :

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu sans extrait de viande et additionné de pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH (MRSBCP-EV), dont

la seule source de carbone serait l'un des sucres : l'arabinose fructose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, saccharose et le D-xylose. Les solutions sucrées sont préparées à 3% et stérilisées. Un millilitre de solution de sucre est additionné à 10 ml de MRSBCP-EV. De ce fait, la plaque Elisa est utilisée pour ses puits, afin d'éviter l'utilisation de tubes à essai avec chaque souche étudiée, les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches. Une solution bactérienne servant à ensemencer les puits contenant les différentes sources de carbone a été préparée. Une culture de 18 heures de la souche appropriée est centrifugée à 8000 tr /min pendant 15min. le culot est récupéré et additionné de 2 ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur. A ce culot 5ml de milieu MRSBCM-EV est additionnée pour fournir la solution cellulaire servant à ensemencer les puits de la plaque Elisa contenant différentes sources de carbone ; 0,1 ml de cette solution bactérienne est déposée dans chaque puits. La lecture des résultats se fait après 24 et 48h d'incubation (**Guessas, 2007**).

IV 2-5-Conservation des souches :

Deux types de conservation de nos souches sont notés :

➤ **Conservation courte durée:**

Les souches sont ensemencées sur gélose Elliker inclinée en tube. Ces cultures sont gardées à 4°C.les repiquages se font toutes les deux semaines.

➤ **Conservation longue durée :**

Pour conservation de longue durée une culture de 18h est centrifugée (4000 tr /min pendant 10 min). Puis le culot est lavé. Le milieu de conservation est présenté par du lait écrémé auquel est additionnée du glycérol à 30% et 1% d'extrait de levure. La culture est conservée à -20°C pour longue durée.

Chapitre IV

Résultats et Interprétations

IV-Résultats et interprétations :

1- Pré-identification des souches :

Lors de cette étude nous avons purifiée les souches isolées à partir du lait cru de chamelle.

1-1-Aspect macroscopique :

-Sur milieu solide :

Cette étape consiste en la description des colonies obtenues après isolement. L'observation macroscopique des cultures sur les géloses, révèle la présence des colonies de petite taille < 3mm, blanchâtre, ou crème, lenticulaires ou circulaires, brillantes, parfois, les bords de certaines colonies sont plus claires et éblouissantes, aspect opaque ou muqueux (**Figure 4**).

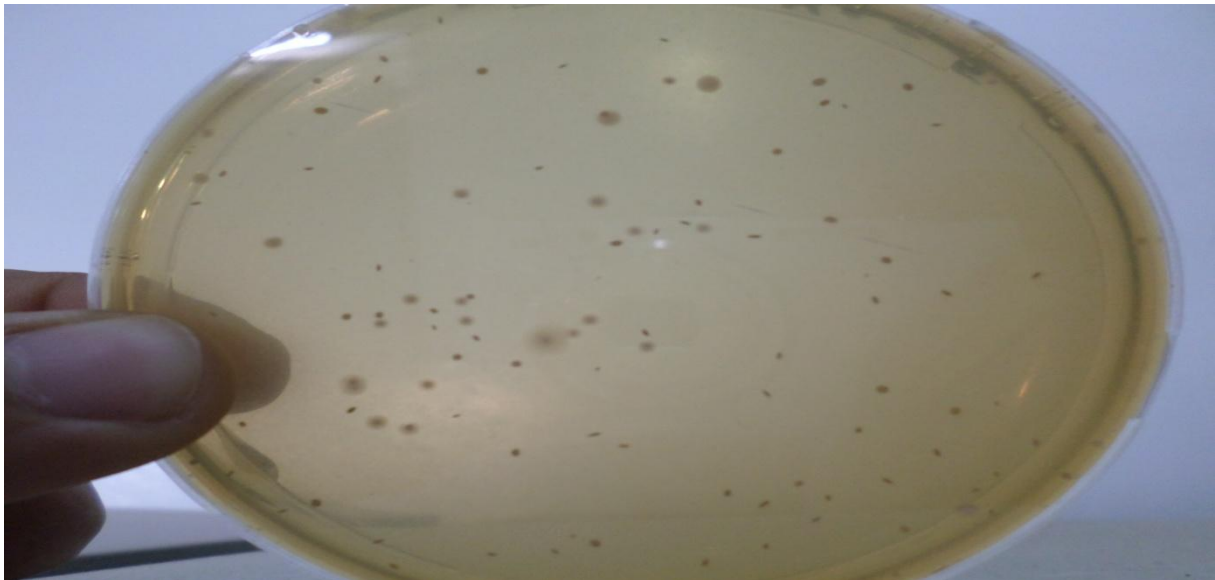


Figure 4: colonies développées issues du lait de chamelleensemencé sur milieu Elliker lactosé

- Sur milieu liquide :

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène (du total des souches isolées sur bouillon Elliker lactosé 32 souches) (**figure 5**).

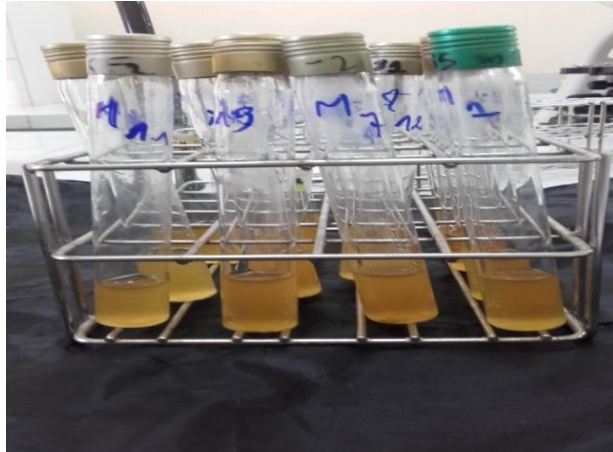


Figure 5 : Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide ELLIKER lactosé



Figure 6 : Aspect macroscopique d'une culture pure dans un milieu solide ELLIKER lactosé

1-1-1-Test de la catalase :

Test de la catalase a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par **Prescott *et al.*, 2003**. Ce test consiste à mettre une colonie prélevé du l'eau oxygénée, le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

D'après ce test, les souches purifiées présentent une catalase négative. Ce caractère indique l'appartenance des bactéries lactiques au genre *Lactococcus* (bactéries à Gram+ aérotolérantes à ne pas posséder de système respiratoire ni cytochrome, ni catalase) (**DESMAZEAUD et DE ROISSART, 1994**).

1-2-Aspect microscopique :

1-2-1-Examen à l'état frais

L'examen à l'état frais montre des souches sous forme de coques immobile

1-2-2-Examen après coloration de GRAM :

La coloration de Gram montre que les souches isolées sont à Gram positives. Représente en monocoques, d'autre regroupées en diplocoques ou en chainettes (**Figure 7**).

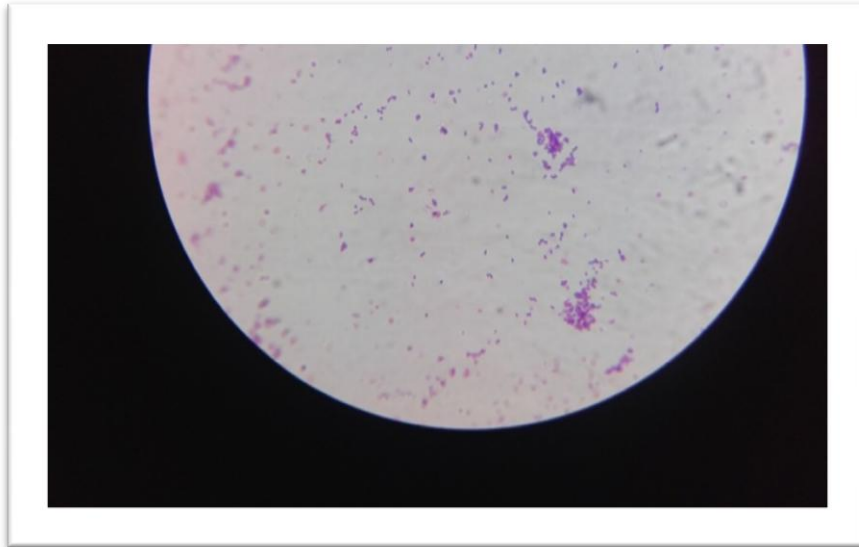


Figure 7 : L'observation microscopique des Lactocoques après coloration de GRAM (G_x 100).

2-Identification des souches :

La coloration de Gram et le test de la catalase ont permis de sélectionner 15 souches. Les isolats Gram positif, catalases négatifs sont étudiées pour déterminer leurs espèces.

Les souches ont été identifiées en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques, selon les techniques d'identification décrites par **Larpent (1997)**. Les résultats des tests physiologiques sont résumés dans le **tableau 5**.

Tableau 5: résultats des tests physiologiques.

Tests	Gram	forme	Type fermentaire	B.M		ADH	ACT	CTR	NaCl		T°				pH	
				1%	3%				4%	6.5%	10°C	40°C	45°C	RES	pH4	pH9.6
isolats																
M14	+	Coque	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+/-	-	-	-	-
M23	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M24	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M5	+	Coque	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M20	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M7	+	Coque	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M6	+	Coque	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M21	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M4	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M19	+	Coque	H.F	+-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
M2	+	Coque	H.F	+	-	+	+	v	-	-	+	-	-	-	-	-
M12	+	Coque	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M28	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M16	+	Coque	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
M10	+	Coque	H.F	v	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-

H.F : homofermentaire, B.M : bleu de méthylène, ADH : hydrolyse de l'arginine, ACT : production de l'acétoine, CTR : fermentation du citrate, RES : thermorésistance à 63,5 °C pendant 30 min, V : variable, +/- : variable, % : concentration de NaCl.

2.1-Type fermentaire :

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicocoques, 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 (Thompson et al., 1994).

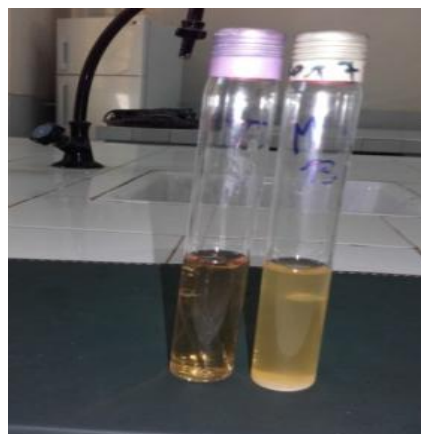


Figure 8 : Résultat de type fermentaire des isolats.

2.2-La croissance en conditions hostiles (NaCl, pH, en différents température) :

➤ NaCl (4% et 6%) :

- La présence des troubles sur milieu hypersalé (4% NaCl), donc le résultat est positive (**figure 9**).
- Pour le test de résistance sur milieu hypersalé de 6.5% de NaCl, Aucune croissance des isolats purifiés n'a été constatée (**figure 10**).



Figure 9: Résultat du test de croissance sur milieu hypersalé (4% NaCl)



Figure 10 : Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (6,5% NaCl).

➤ Le pH :

- Nous avons remarqué que la majorité des souches testées incapable de croitre sur PH 9,6 (**figure11**).



Figure 11 : Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.

- La présence des troubles microbiens dans la souche M10 à PH4, résultat positives (**figure 12**).



Figure 12 : Résultat de la croissance des isolats à pH 4.

➤ **La température :**

La croissance est mise en évidence par la présence de troubles. Selon la température optimale de croissance, les bactéries sont classées en mésophiles dont la température est 30°C et les thermophiles avec une température optimale de croissance allant de 40°C (**Frank *et al.*, 2002**).

2.3-Thermorésistance :

Ce traitement de thermorésistance permet de sélectionner les lactocoques en éliminant les streptocoques et les entérocoques. Toutes les souches ne survivent pas après un traitement de thermorésistance (absence des troubles pour tous les isolats testés).

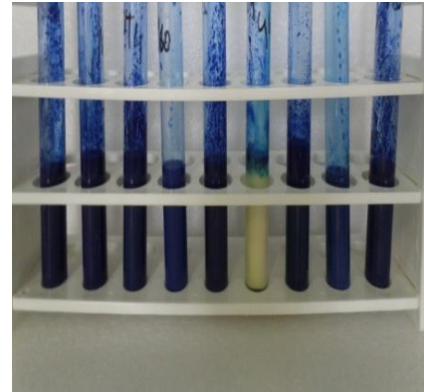
2.4-Test de lait de Sherman:

Ce test est basé sur le mode respiratoire des souchesensemencées. On a toutes les souches

qui ont donné des résultats négatifs pour le bleu de méthylène 3%, ceci signifie que ces souches sont des lactocoques qui sont microaérophiles, il ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilise tous l'oxygène de bleu de méthylène (Larpent *et al.*, 1990), l'obtention d'un caillé blanc s'explique par l'augmentation de la charge bactérienne (Figure 13).



A



B

Figure 13: Résultat du test de lait de Sherman

A: 0,1 % de Blue de méthylène ; **B :** 0.3 % de bleu de méthylène.

2-5- hydrolyse de l'arginine :

Les cultures des isolats ont montré que plusieurs souches n'hydrolysent pas d'arginine comme les isolats M5, M6, M7, M12, les autres souches restantes sont arginine positives comme les isolats M14, M23, M24, M20, M21, M4, M19, M2, M28, M16, M10. (figure14).

Les réactions observées sont un virement de couleur du milieu vers la couleur jaune après 18h qui s'explique par l'acidification de ce dernier, puis après 48h d'incubation, le milieu réalcalinisé par l'hydrolyse de l'arginine retrouvera sa couleur originelle si l'espèce possède l'enzyme sinon il restera jaune dans le cas contraire (Thomas., 1973).

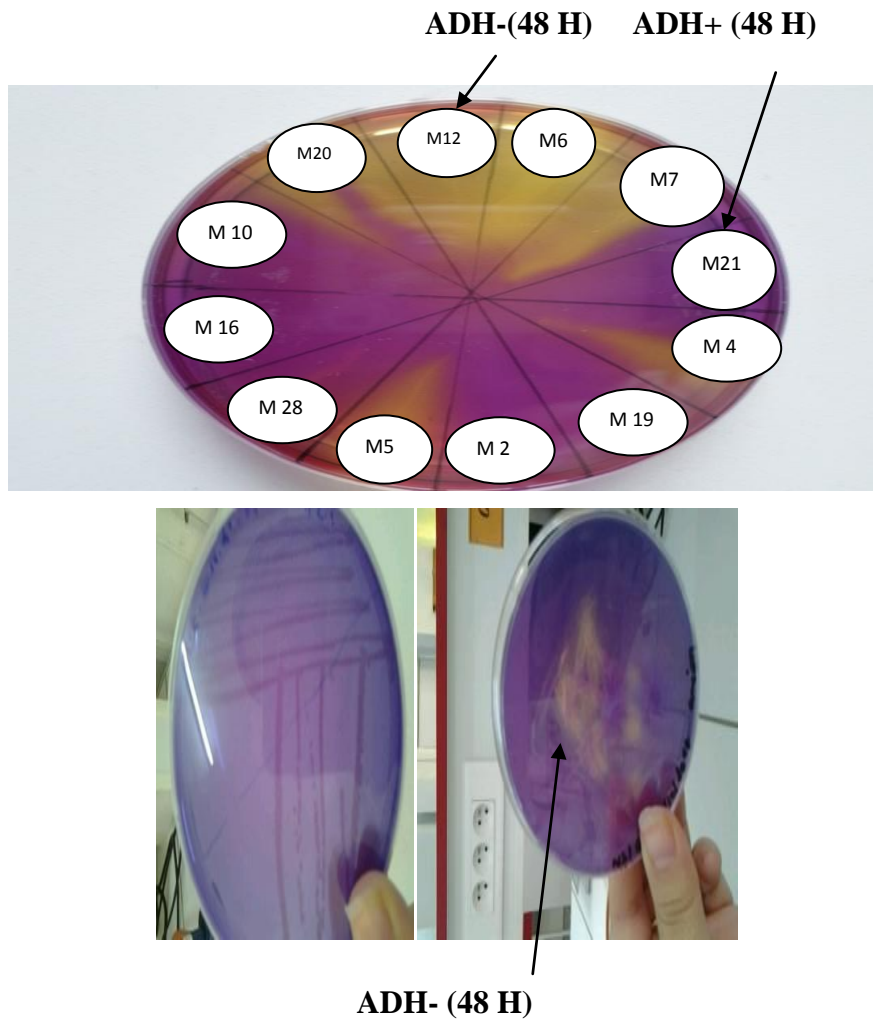


Figure 14 : La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).48H.

2-6-Production de l'acétoïne :

Les cultures des isolats ont montré que plusieurs souches ne produisent pas de l'acétoïne comme les isolats M20, M21, M23, M24, M4, M16, M28, les autres souches restantes sont production positives comme les isolats M14, M5 M7 M6, M12, M19, M2, M10 (**figure15**).

La production d'acétoïne est un test important pour l'identification des espèces, Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, les espèces de *Lc.lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser le diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α -acétolactate (**Raynaud et al., 2003 ; Leroy et Devuyst., 2004**).

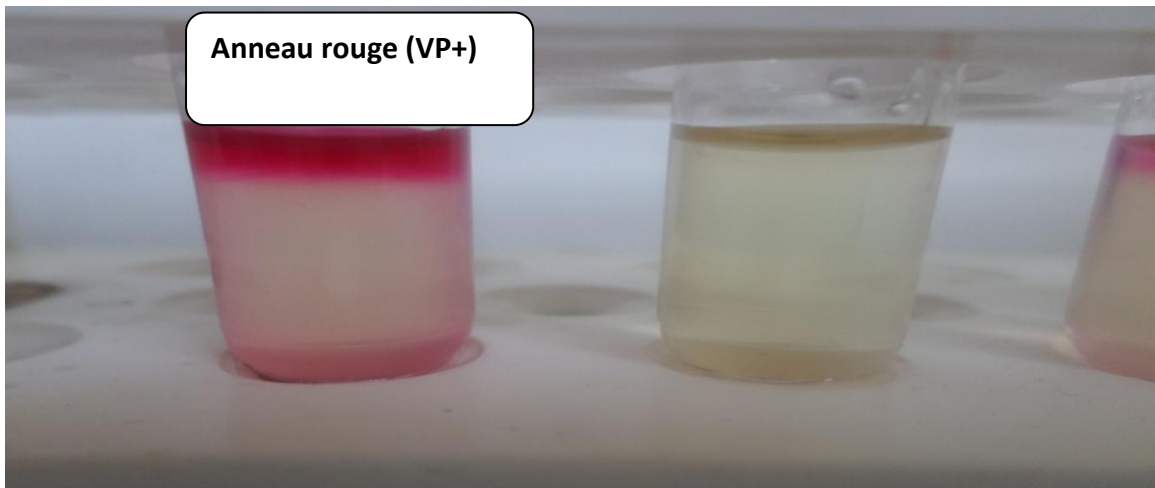


Figure 15 : Test de la production d'acétoïne.

2-7- fermentation du citrate :

Le milieu KMK différencié entre les bactéries qui utilisent le citrate pour donner des produits aromatiques et les bactéries qui n'utilisent pas le citrate. Dans le premier cas les résultats se manifestent par des colonies de couleur bleu contrairement les résultats négatif donnent des colonies de couleur blanche (**figure 16**).

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car chez ces bactéries le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO₂, participant aux qualités aromatiques et texturales des produits en agro-alimentaires (**Raynaud *et al.*, 2003**).

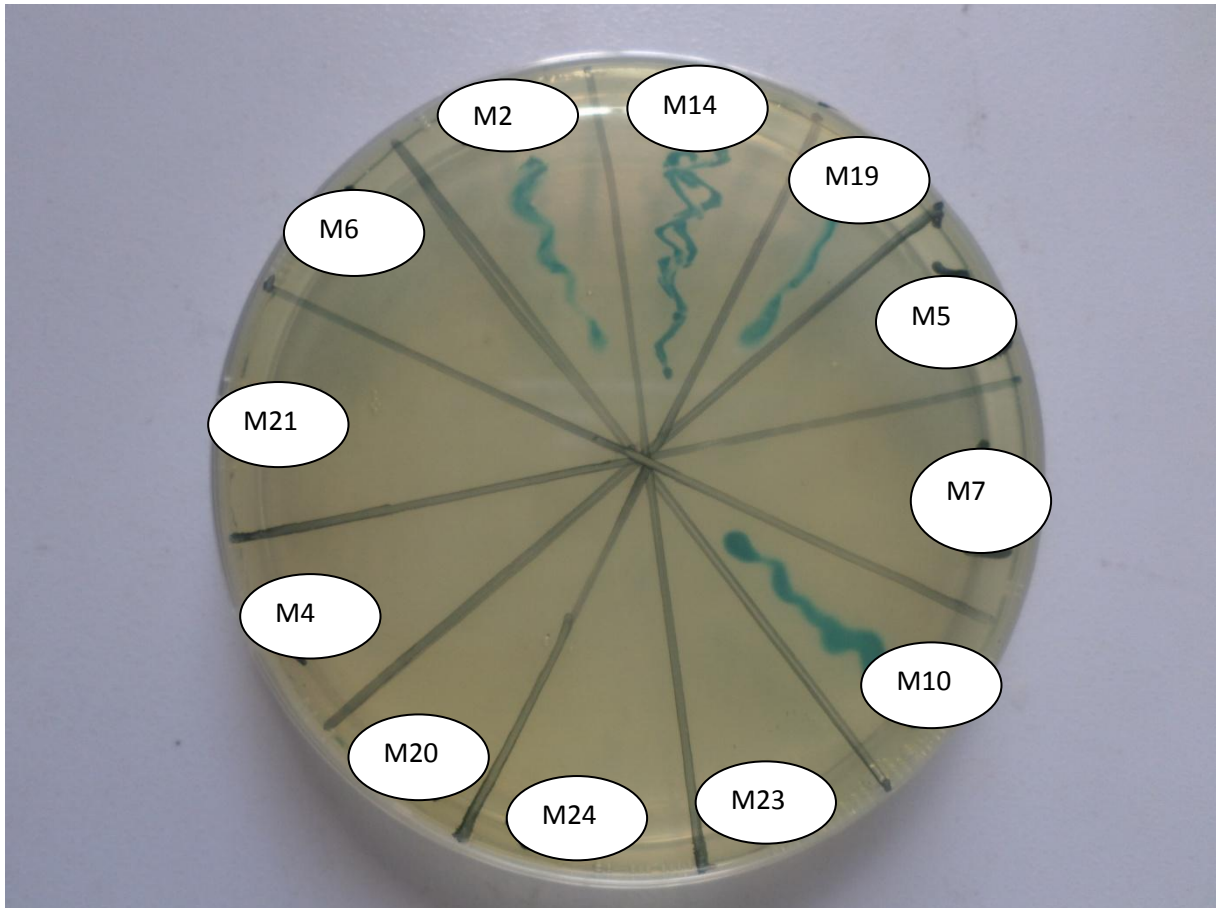


Figure 16 : Test de réduction de citrate sur milieu KMK.

2-8-Profil fermentaire :

Ce test est utilisé pour but d'identifier les isolats au niveau de l'espèce, Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 6**.

Le profil fermentaire des sucres nous a permis de confirmer la pré-identification de nos isolats en se basant sur des données bibliographiques établis par (**Carr *et al.*, 2002 et Khedid *et al.*, 2009**).

Tableau 6: Profile fermentaires des souches isolées.

Sucres	Mannitol	raffinose	Amidon	Lactose	D-xylose	Sorbitol	Arabinose	Maltose	fructose	Rhamnose	esculine	Saccharose	Souches identifi�
M14	+	-	-	+	-	-	+	+	+-	v	+	-	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bi ovar. <i>diacetylactis</i>
M23	-	+	-	-	+	+	+	+-	+	+	+	-	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M24	-	+	-	+	+	+-	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M5	-	+-	-	-	+	-	+	+	+	-	v	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
M20	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M7	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
M6	-	+-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
M21	-	+	v	+	+	+	+	+	v	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M4	-	+	-	+	+	+	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M19	+	-	-	+	-	-	+	+	v	v	+	-	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bi ovar. <i>diacetylactis</i>
M2	+	+-	-	+	+	+-	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
M12	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
M28	-	+	-	+	+	+	+	+	v	v	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M16	-	+	-	+	+	+	+	+	v	v	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
M10	+	-	-	-	+-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i>

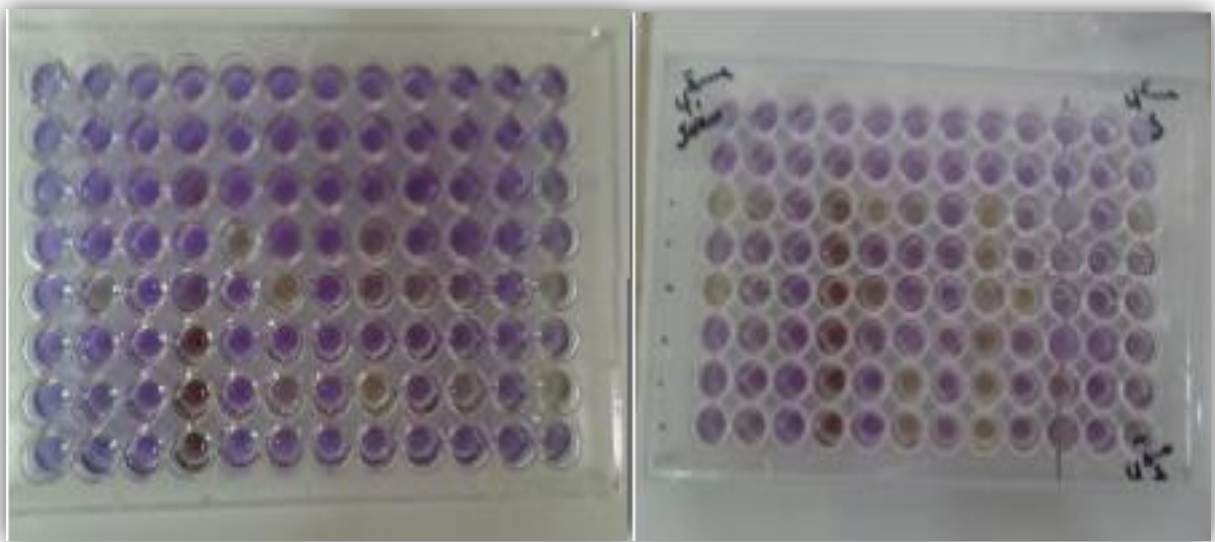


Figure 17 : Le profil fermentaires des isolats effectué sur plaque d'Elisa.

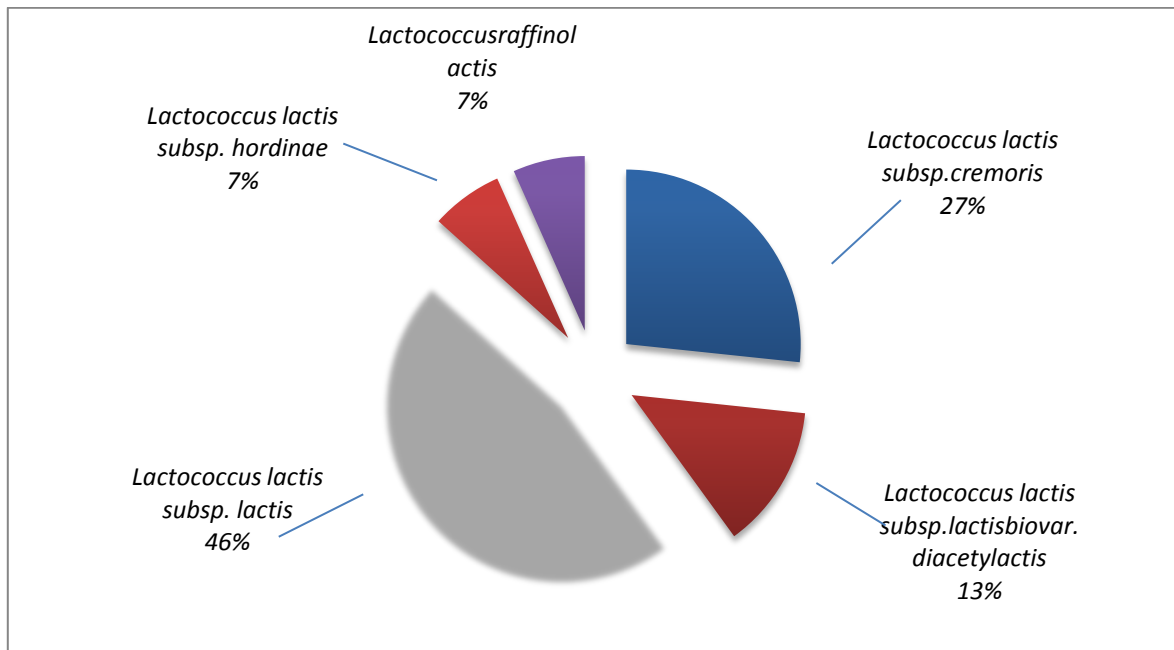


Figure 18 : Distribution des espèces de *lactococcus* selon le nombre des souches

Discussion générale :

A partir d'un seul échantillon de lait cru de chamelle de race sahraoui provient de la région khayter bogtob wilaya Bayadh, nous avons isolé 15 souches de genre *lactococcus*, elles se sont révélées positives à la coloration de gram et catalase négative.

L'étude macroscopique réalisée sur milieu solide nous a permis d'observer de petites colonies blanchâtres, lisses et régulières. L'examen microscopique nous a permis de sélectionner des bactéries qui présentent une forme sphérique, qui se colorent positivement à la coloration de gram, et qui sont immobiles et asporulées (**tableau 5**).

Les souches isolées dans le présent travail sont de type homofermentaire (absence de dégagement de CO₂ dans la cloche de Durham) (**Figure 8**). Ce résultat est de nature à indiquer que cette souche appartient au genre lactococcus (**SEBASTIEN, 2008**).

Parmi ces isolats, certaines sont capables de croître à 40°C et non pas à 45°C, et non plus à pH 9,6, elles peuvent pousser en présence de 4% de NaCl et non pas à 6,5%, elles ne survivent pas après leur exposition à 63,5°C pendant 30 min.

Selon les travaux de **DeRoissart (1986)** ; **Guirad (2003)** ; **Bekhouche et boulahrouf (2005)** ; les isolats qui ont une forme des coques associée en chaînette de longueur variable et qui sont homofermentaire, mésophile et ont une inhabilité de croître à pH 9,6 à 6,5% de NaCl et incapables de résister à 63°C pendant 30 minutes et qui possèdent de l'arginine et ne possèdent pas d'acétoïne et peuvent dégrader le glucose, le maltose, le raffinose, et le saccharose sont des *lactococcus lactis* et les mêmes résultats ont été observés pendant notre étude ce qui indique les isolats (M23, M24 M20, M28, M16, M4, M21) sont caractérisés comme souches des *lactococcus lactis*.subsp *lactis*.

Certaines souches M5, M6, M12, M7, poussent à 40°C et non pas à 4% de NaCl, hydrolysent l'esculine et ne métabolisent pas le citrate, ne produisent pas d'acétoïne, elles sont ADH-, ces isolats peuvent s'apparenter à *Lactococcus lactis* subsp. *Crémoris* fermentent peu d'hydrocarbures (**Badis et al 2004** ; **Guessas et al ., 2012** ; **Hadef, 2012**) majoritairement ces isolats fermentent le mannitol, le D-xylose et fermentent rarement le maltose et l'arabinose, ne fermentent pas le raffinose ni le ribose.

Une seule souche produit l'acétoïne, ADH+, résiste à 40°C, est pré-identifier *Lactococcus lactis* subsp. *hodinea* . Notre résultat semble très similaire à celui décrit pour *Lactococcus lactis* subsp. *hodinea* (**Badis et al., 2004**).

M19, M14 fermentent l'arabinose et le mannitol et le lactose, ne fermentent pas le ribose le sorbitol le raffinose et l'amidon. Cette souche est capable de métaboliser le citrate, cet isolat peut s'apparenter *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (**Badis et al., 2004 ; Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara et a ., 2004 ; Lee et al., 2006**).

M2 hydrolyse l'esculine, réduise le citrate, ADH+, fermente le raffinose et ne fermente pas le sorbitol, cette souche peut s'apparenter à *Lc raffinolactis* (**Badis et al., 2004**) (**Lopez et Mayo, 1997 ; Mathara et al., 2004 ; Lee et al., 2006**).

Le pourcentage des souches *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* 46% et les souches *Lactococcus lactis* subsp *hordinae* 7%, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 13%, *Lactococcus raffinolactis*.7%, *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris* soit un pourcentage de 27% (**voir figure19**).

La présence des espèces de *Lc lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, et *Lc lactis* subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis*, dans le lait cru de chamelle offre la possibilité d'utiliser cette gamme de micro-organismes comme inoculum (levain) dans les produits laitiers.

Conclusion

Conclusion :

Au terme de cette étude dont l'objectif est d'isoler et de purifier des souches appartenant aux genres *Lactococcus* à partir de lait de chamelle cru, il en ressort 15 souches parmi une totalité de 32 isolats de bactéries lactiques. L'identification de ces 15 souches isolée, basée sur les techniques qui caractérisent la morphologie et les différents métabolismes biochimiques et physiologiques a permis d'en ressortir :

- Sept souches M23, m24, m20, m28, m16, m4, m21 appartenant au genre *Lactococcus* présumé appartenir à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.
- Quatre souches M5, M6, M12, M7 appartenant au genre *Lactococcus* présumé appartenir à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.
- Deux souches M19, m14 appartenant au genre *Lactococcus* présumé appartenir à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
- Une seule souche M2 appartenant au genre *Lactococcus* présumé appartenir à l'espèce *Lactococcus raffinolactis*.
- Une seule souche M10 appartenant au genre *Lactococcus* présumé appartenir à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *Hordinae*.

Nos résultats assez intéressants ouvrent les perspectives :

- Essayer de fabriquer un lait fermenté à l'aide des souches lactiques testées.
- Etudier les caractères biotechnologiques des souches isolées.
- Identification moléculaire des isolats.
- Etudier les cinétiques de croissances et de l'acidité des souches.

Références bibliographiques

A

Ahmed Faris., Mohd Adnan ., Irene K.P.Tan ., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assesement of the isolates for industrial potential .Bioresource Technology .98: 1380-1385.

ANTOINE J.M., ADAM F., FAZEL A., HARTEL Y.D., (1993). Bactéries lactiques en alimentation humaine, *bactéries lactiques* 2. Ed. Loriga; 419-428.

AUBERT C., (1998). Caractérisation microbiologique du fromage type Venaco : un fromage de corse à pâte molle. *Rap.* Ecole nationale supérieure de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation, Corté, France.

Axelsson L.T., (1993). Lactic acid bacteria : classification and physiology. P.1-64. *In* : De Salmien S., von Wright A.(ed) *Lactic acid bacteria*. Marcell Dekker, Inc., New York, Etats-Unis.

B

Balla A., (2011). Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin. Thème de Magistère. Université d'ouargla.Algérie.

Bazo M., (2011). Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Strephylococcus AUreus* résistant à la méthiciline (SARM). Mémoire

BEN –AISSA M., (1989). Le dromadaire en Algerie. Options Méditerranéennes - Série Séminaires - n 2, 19-28.

BENGOUMI M., FAYE B., TRESSOL J. C., (1998). Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. In Bonnet P, éd. Dromadaires et chameaux, animaux laitiers. Actes du colloque, 24-26 Octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie. Montpellier, France : Cirad.

Ben-Yahia L., (2012). Etude du dialogue hôte / bactéries lactiques du yaourt chez drats gnotobiotiques. Thèse pour obtenir le grade de docteur délivré. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement: 21p.

Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988. Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane lait : 1: pp 65-84.

C

Carmen. M ., Jan Kok, EH ., Pelaez, C., requena., T et Buist G., (2000). Applied and Environmental Microbiologie, Aug., Pp: 3174-3179.

Carr F.J., Chill D., Maida N., (2002). The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol.* 28 :281-370.

Corrieu G., Luquet F M., (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France : pp 472 -676.

CORRERA A., (2006). Thèse de doctorat en écologie et gestion de la biodiversité. Muséum national d'histoire naturelle Paris.

Cottin M. G., (2000). Les animaux domestiques dans les sociétés pastorales nomades : Rôles économique et socioculturel. Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. France.

D

Dellaglio F., de Roussard H., Torriani S.,Curk M.C.,Ganssens D.,(1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. p.25-116.In : De Roussard H., Luquet F.M. (ed) Bactéries Lactiques. Vol 1 . Lorica :Uriage,Paris, France.

De Roissart H., Luquet F.M., (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.

Desmazeaud M., 1983 - Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait.Technique laitière: 976 : pp11-14

Desmazeaud M.J., De Roissart H., (1994). Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». De Roissard et Luquet, Tech.Doc.,Lavoisier, Paris.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K-H., Whitman W. B., (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 3: the *Firmicutes*, Springer USA, 1422 p.

Diallo B.C., (1989). L'élevage du dromadaire en Mauritanie. Options Méditerranéennes Série Séminaires- n° 2 : 29- 32.

Doleyres Y., (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.

DORTU C., THONART P., (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1): 143-154.

Drider D., Prevost H., (2009). Bacteries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : pp 381- 427.

Dupuy C P., (2004). Accidents alimentaire d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon 47.

E

EL-AGAMY E.I., ABOU-SHLOUE Z.I., ABDEL-KADER Y.I., (1998). Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. *Alexandria J. Agric. Res*, **43(2)**, 57-70.

Elliker P. R., Anderson A. W., Hannesson G., (1956)., “An Agar Culture Medium for Lactic Acid Streptococci and Lactobacilli,” *Journal of Dairy Science*, Vol. 39, No. 11, , pp. 1611-1612.

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

F

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

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

FAYE B., (1997). Guide de l'élevage du dromadaire. Editions SANOFI. Santé et Nutrition Animale. 126 pages.

FAYE B., (2004). Performances et productivité laitière de la chamelle: les données de la littérature. Lait de chamelle pour l'Afrique. FAO. Rome. P. 7-15.

Fenton M.P., (1987). An investigation into the sources of lactic acid bacteria in GRAS silage. J. Appl. Bacteriol. 62 : 181-188.

Frank J, Caw, Donchill et Minomaid A, 2002: The lactic Acid Bacteria: A literature survey, CA, 94112, Critical Reviews in Microbiology, 28(4): 281-370(2002): 291-305.

FREDOT E., (2006). Connaissance des aliments-Basses alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et lavoisier : 25(397pages).

G

Gafner Jean-Louis., (2012). La qualité microbiologique des aliments pour animaux, Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 1725 Posieux.

GAST Marceau., 1968. *Alimentation des populations de l'Ahaggar, étude ethnographique*, Mémoire du CRAPE n° VIII, Paris, Arts et métiers graphiques : 457 p.

GAST M., MAUBBOIS J.L., ADDA J., (1969). Le lait et les Produits Laitiers au Ahaggar. Centre de Recherches Anthropologiques, Préhistoriques et Ethnologiques Paris, France.

GIRRAFA G., BERGERE J. L., (1987). Nature du caractère épaississant de certaines souches de *Streptococcus thermophilus* an biochemistry of cheese and fermented milk. Ed. Elsevier, London. pp35-36.

GREAUME A., (1975). Le lait cru : ce qu'il doit être, comment l'obtenir. Th. Méd. Vét., Toulouse, n° 102,90 p.

Guessas B., (2007). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. Algérie.

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

H

HARTLEY P., DUONG C., DAVID P. et FAZEL., (1989). Synbiosis of yoghourt microorganisms. *Les laits fermentés. Actualités de la recherche*, 139-145.

Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. Et Schillinger U., (2001).

Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73(suppl)**: 365S–73S.

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis In't Veld J. H. J., (1998).

Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. food Microbiol.* 41 : 85-101.

Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.

I

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

Imbert M., Bondaue R., (1998) .On the iron requirement of *lactobacilli* grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 37: pp 64-66.

K

Kamoun M., (1995). Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie.

KAMOUN M. , RAMET J. P., (1989). Conservation et transformation du lait de dromadaire. *Options Méditerranéennes, Série séminaires, n° 6:* 229-231.

KARRAY N., LOPEZ C., LESIEUR P., OLLIVON M., (2004). Dromedary milk fat: thermal and structural properties 1. Crystalline forms obtained by slow cooling. *Lait* 84, 399-416.

KARUE C. N., (1998). The dairy characteristics of the Kenyan camel. In P. Bonnet (Ed.), Actes du colloque, Dromadaires et chameaux, animaux laitiers/ Dromedaries and camels , milking animals. Nouakchott, Mauritania : CIRAD Publishing, 55-60.

Kelly W.J., Davey G.P., Ward L.J., 1998. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 45 : 85-92.

Kempler GM., McKay LL., (1980) . Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp.*diacetylactis*. Appl Environ Microbiol 39:926–927

KHAN B.B., IQBAL A., RIAZ M., (2003). Production and Management of Camels.Dept. Livestock Management.University of Agriculture Faisalabad. Pakistan.

Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A., Et Zinedine A., (2009). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in moroco.Microbiological Research 164, 81-91.

KNOESS K.H., MAKJDUN A.J., RAFIG M. , HAFEEZ M., (1986). Milk Production. Potential of the Dromadary with special reference to the province of Penjab *World Anim. Rev.*, **57**, 11 -21

KONNING S., (1994). Mecanisme de transport des nutriments dans les bacteries lactique in "*Bacteries lactiques*". Ed. Loriga Lavoisier. PP 198-218.

Konuspayeva G. ; Loiseau G. Et Faye B. (2004). La plus-value santé du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan - p. 47-50, In : Onzièmes rencontres autour des recherches sur les ruminants. - Paris : Institut de l'élevage.

L

LARPENT J.P., (1997). Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 10 -73P.

LARPENT J.P., G.M., (1990). Mémento technique de microbiologie .2èmedition.Lavoisier Tecet Doc.Paris .PP471.

LASNAMI K., (1986). Le dromadaire en Algérie, perspectives d'avenir. Thèse Magis. Agro. INA El Harrach. 185 pages.

Laurent, S. et al., (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris*. 307 pages.

LAW B.A., (1984). Flavour development in cheese. In : Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Ed. Elsevier Applied Science Publ., London. PP 185-208.

Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., (1977). A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. Vol 42: pp123-133.

LELLIOTT R.A ., STEAD D.E., (1987). Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants.Blackwell Scientific publications Volume 2.Oxford(GB).

Leroy F., de Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industrie.Trends Food Sci.Technol.15 :67-78.

Letrot C., Juillard V., 2001 - Development of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of *streptococcus thermophilus* .J. APPL. Microbiol: 91: pp 1023-1029.

LEUPOLD J., (1968): Le chameau, important animal domestique des pays subtropicaux.- in : LES CAHIERS BLEUS VETERINAIRES, N°15,1968.-pp 1-6.

LEVEAU J. P., BOUIX M., (1993). Microbiologie Industrielle. Ed : Techniques et documentation. Lavoisier Paris.

Lhote H., (1987). Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et au Sahara. Ed. Office National des approvisionnements et des services Agricoles- Alger ; 161 p.

Luquet F M., (1986). Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343-442.

M

Marshall V.M.E., law B.A., (1984). The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. P 153-186. In : De Davie F.L ., Law B.A. (ed) Advances in the Microbiology and Biochemistry of cheese and Fermented Milk. Elsevier Applied Sciences Publishers.

Mazali J., (1992). Bioconversion de permeat de lactosérum par de cellules lactobacilles in mobilisées sur un support solide. Mémoire. Université du Québec. INRS-EA: pp 5-7.

MEHAIA M.A., (1995): The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, **50**, 260-263.

MESSAOUDI B., (1999): Point de situation sur l'élevage camelin en Algérie, les premiers journées sur la recherche cameline Ouargla, 25-26-27 Mai 1999. p 13-14.

MOHAMED M.A., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M., MOHAMED.M.A., (1990). Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, 45, 716-718.

N

NOVEL G., (1993). Les bactéries lactiques in " Microbiologie industrielle" Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau, G.V., Bouix, M. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.

O

OULD AHMED M., (2009). Caractérisation de la population des dromadaires (*Camelusdromedarius*) en Tunisie. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de tunisie.

O'SULLIVAN L., ROSS R.P. ET HILL C., (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84: 593-604.

P

Pandey A., Bringel F., Meyer J M., (1994). Iron requirement and 5 earch forside rophoresincactic acid bacteria. *Apple. Microbiol. Biotechnol*: 40: pp 735-739.

Paul Ross R., Morgan S. ., Hill C., (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.*79:3-16.

PETRANSXIENE D., (1981). Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, deuxième édition, Paris, 221p.

Prat M.L., (1993). L'alimentation du dromadaire. Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort ; n° 113 : 111 p.

PRESCOTT L.M., HARLEY D.A., KLEIN D.A., (2003). Microbiologie, deuxième édition, Paris, 1136p.

R

RAMET J.P., (1993). La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113

Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M., Loubière P., (2003). Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023

RICHARD D., GERALD D., (1989). La production laitière des dromadaires Dankali (Ethiopie). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trp.*, 42, 97-103.

S

SAIDI M., SIBOUKEUR O., OULED BELKHEIR A., GUERRADI., (1999). Caractéristiques physico-chimiques, composition et qualité bactériologique du lait de chamelle population sahraoui (wilayates d'Ouargla et Ghardaïa). Aptitudes technologiques. Premières journées sur la recherche cameline, Ouargla: 129-133.

Sandine WE., Radich PC., Elliker PR., (1972). Ecology of the lactic streptococci. *J. Milk Food Technol.* 35 : 176-184.

SAVADOGO A ., A. TRAORE A.S ., (2011). La flore microbienne et les propriétés ; fonctionnelles des yaour ts et laits fermentés *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-2075.

SAWAYA W.N., KALIL J.K., AL-SHALHAT A., AL-MOHAMED H., (1984). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci.*, , 744–747.

SCHLEIFER K M., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BLAZ R., COLLINS ., W. FISCHER., (1985). Transfer of streptococcus lactics and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. *Applied microbiology.* 6 :183-195.

SCHMIDT J.L., TOURNEUR C., LENOIR J., (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologie laitière : Bactéries lactiques. Vol : 2. Ed. Loriga Lavoisier, Paris, 37 45.

SEBASTIEN M., (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de doctorat. Université de Nantes faculté des sciences et techniques. 189 P.

SKIDMORE J.A., (2005). Reproduction in dromedary camels: an update. *Anim. Reprod.*,2, N°3, p.161-171.

SMAIL R., (2002). Isolement et caractérisation des protéines majeurs du lait de chamelle collecté dans les régions d'Ouargla et de Tamanrasset. Thèse de Magister, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université de Bejaia, 1-75.

SookKhee S., Chulasiri M., Prachyabrued W.,(2001). Lactic Acid Bacteria from healthy oral cavity of thai volunteers : inhibition of oral pathogens .*J. Appl. Microbiol.* 90 : 172-179.

SIBOUKEUR A ., SIBOUKEUR O., (2012). Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle collecté localement en comparaison avec le lait bovin. Vol. 4, N° 2

Stiles M.E., Holzapfel W.H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.

T

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.

THOMAS, T.D., (1973). Agar medium for differentiation of *streptococcus cremoris* from the other bacteria.*N.Z.J.Dairy.Sci.Tech.*8:70-71.

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

TORMO H., (2010). Diversité des flores microbiennes du lait cru de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse, 238 pages.

V

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K., Swwings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60** : 407.

Vaillan court K., Moineau S., Frenette M., Lessard C., Vade boncoeur C., (2002).Galactose and Lactose Genes from the Galactose-Positive Bacterium *Streptococcus salivarius* and the Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization. Sequence. Transcription. and Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology*: 184: pp 785-793.

Van den Bogaard P T C., Hols P., Kleerebezem M., Kuipers O P., de Vos W M., (2004) .Sugar utilization and conservation of the gal-lacgene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol*: 27: pp 10-17.

Vilain .A-C., (2010) April .Revue Française d'Allergologie, Volume 50, Issue 3, Pages 124-127.

W

WANGOH J., FARAH Z., PUHAN Z., (1998). Iso-electric focusing of camel milk proteins. *Int. Dairy J.*, **8**, 617-621.

Wood B J B., Holzapfel W H (éditeur)., (1995). The Lactic acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria 2nd Ed, Blackie Academic and Professional London: 2: pp 40-90.

Y

YAGIL R., (1982). Camels and Camel Milk. FAO, Animal Production and Health, Paper N° **26**, 1-69.

YAGIL R., ETZION Z., (1980): Effect of drought conditions on the quality of camel milk. *J. Dairy. Res.*, 47, 159-166.

YAGIL R., ETZION Z., (1980). Milk Yields of Camel (*Camelus dromedarius*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **67**, 207-209.

YAGIL R., ZAGORSKI O., VAN CREVELED C., (1994). Science and camel's Milk Production. Actes du Colloque : « Dromadaires et chameaux animaux laitiers », 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

Z

ZEUNER F. E., (1963). A History of Domesticated Animals. Hutchinson Ed. London Publishers. 1963. 537 p.

[http://almanach-dz.com/index.php?op=fiche&fiche=49.](http://almanach-dz.com/index.php?op=fiche&fiche=49)

Annexes

Milieux de cultures :

-La composition des différents milieux est exprimée (g/L). Tous les milieux sont stérilisés à 120°C pendant 20 min.

Annexe I**Milieu Elliker lactosé (Elliker, 1956) :**

Composant	g/l
Tryptone	20g
Extrait de levure	5g
Gélatine	2,5g
NaCl	4g
Acétate de Sodium	1,5g
Glucose	5g
Lactose	10g
Acide ascorbique	0,5g
L'eau distillée	950ml

pH= 7.

Eau physiologie :

Composant	g/l
Chlorure de sodium	8,5g
Peptone	0,5g
Eau distillée	950ml

pH=7.

Bouillon hypersalé :

Composant	g/l
Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl	40/65g
Eau distillée	950ml

PH=7,2

Lait écrémé :

Composant	g/l
Lait écrémé en poudre	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée	950ml

Lait de Sherman

Composant	g/l
Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée	950ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0.1%de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20mn. Et pour avoir un lait à 3% de bleu de méthylène , on ajoute au moment de l'emploi 1 ml de bleu de méthylène à 3%.

Clark et Lubs :

Composant	G /L
Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	950ml

PH=7,4.

Milieu KMK (Kempfer Mc Kay, 1980) :

Composant	g/l
Biopolytone	3g
Glucose	2,5g
Agar	15g
Eau distillée	950ml

PH=6,6.

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

Milieu M16BCP (Thomas, 1973) :

Composant	g/l
Peptone papinique de soja	5g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Lactose	2g
Acide ascorbique	0,5g
Acétate de sodium	1,8g
L'arginine	4g
Pourpre de bromocrésol	0,05g
Eau dictillée	950ml

pH=6,5.

Annexe II : réactifs et tampon

Réactif VPI et VPII:

Réactif VPI : solution de soude (NaOH) à 16% (p/v) dans l'eau distillée.

Réactif VPII : α -naphtol à 6% (p/v) dans l'alcool.

Annexe III

❖ Observation à l'état frais :

Examen à l'état frais : pour apprécier la mobilité et la morphologie bactérienne, nous avons réalisés suivi les étapes suivantes :

- Premièrement, nous préparons une lame et une lamelle de verre propre et sec,
- Déposer une goutte de l'eau physiologique sur lamelle,
- Au tour de bec benzène, nous prélevons une colonie de boîte étudié qui est déposée au centre de la lame (sur la goutte de l'eau physiologique), Bien étalé,
- Recouverte d'une lamelle, L'observation est faite rapidement dans à l'objectif 40.

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- * Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- * Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- * Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- * Décolorer avec de l'alcool, puis rincer à l'eau ;
- * Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- * Laver à l'eau ;
- * Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (Gx100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose

