



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BELLAL IBTISSAM

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: microbiologie appliquée

THÈME

**L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques
isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis les
souches pathogènes**

Soutenue publiquement le 01/07/2018

DEVANT LE JURY

Président	M. Laissouf .Ahlem	(MCB)	U. Mostaganem
Examineurs	Mr. Bouzned ahcene	(MCB)	U. Mostaganem
Encadreur	Mme Mahmoudi.Fatima	(MCB)	U. Mostaganem

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé.....01

Summary02

الملخص.....03

Analyse bibliographique

Introduction générale.....04

Chapitre n° I : Généralités sur le dromadaire et le lait camelin:

1) Aperçue sur les dromadaires05

2. Origine du dromadaire05

3. Taxonomie et race05.

4. Les races algériennes du dromadaire.....06

5. Production laitière en Algérie07.

6. Le lait camelin définition07

7. Caractéristiques du lait de chamelle.....07

7.1. Caractères physiques et organoleptiques.....07.

7.2. Propriétés nutritionnelles de lait de camelin08

7.3. Caractéristiques microbiologiques du lait camelin08

8. Comparaison entre le lait de différents mammifères	09
---	----

Chapitre II : les bactéries lactiques et les probiotiques

1. généralités sur les bactéries lactiques

1.1. Définition	10
1. 2. Habitat	10
1. 3. Taxonomie.....	10

2. Les différents groupes des BAL.

2.1. Le genre de *lactobacillus*

2.1.1. Définition	11
2.1.2. Habitat	12
2.1.3. Classification	12
2.1.4. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	13

2. 2. Le genre *leuconostoc*

2.2.1 Définition.....	14
2.2.2. Habitat.	14
2.2.3. Classification.....	14
2.2.4. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques	

2.3. Le genre de *lactococcus*

2.3.1 Définition	15
2.3.2. Habitat.....	15
2.3.3. Classification	15
2.3.4. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	15

2.4. Le genre de *streptococcus*

2.4.1. Définition.....	16
------------------------	----

2.4.2. Habitat	17
2.4.3. Classification.....	17
2.4.4. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	

Partie 02 : les bactéries probiotiques

1. l'histoire sur Les probiotiques:.....	18
2. Microorganismes probiotiques.....	18
3. Propriétés probiotiques	18
4. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	19
4.1. Peroxyde d'hydrogène.....	19
4.2. dioxyde de carbone	19
4.3. Le diacétyle	20
4.4 Les acides organiques	20
4.5 Les bactériocines	21
5. Critères de sélection les probiotiques à application intestinal	21

Partie expérimentale :

II) Matériels et méthodes

1) Milieux de culture	22
2. Echantillonnage	22
3. Provenance des souches bactériennes.....	23
4. Paramètres organoleptiques et physique de lait cru de chamelle	23
5. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	23
6. Purification et ré-identification des espèces.....	23
6.1. Critère morphologique.....	23
6.1.1. Examen macroscopique	23
6.1.2. Examen microscopique	23

6.2. Recherche de la catalase	24
6.3. Test de croissance à différentes température et de thermorésistante.....	24
6.4. Test de croissance à différentes concentrations de NaCl.....	24
6.5. Test de croissance à différentes pH	24
6.6. Test hydrolyse arginine l'ADH.....	24
6.7. Test de production l'acétoine.....	24
6.8. Utilisation de citrate	25
6.9. Production de dextrane.....	25
6.10. Vancomycine-Résistance	25
6.11. Test de fermentation	25
6.12. Test d'utilisation des sucres	25
6.13. Test de lait de Sherman.....	26
7. Etude des propriétés technologiques	26
7.1.pouvoir acidifiant.....	26
7.1.1.étude de la cinétique.....	26
7.1.2. Mesure de pH	26
7.1.3. L'acidité titrable.....	26
7.1.4. Étude la cinétique de croissance au milieu lait.....	27
7.2. Etude l'activité antimicrobienne des souches	27
7.2.1. Méthode de double couche (méthode directe).....	27
7.2.2. Méthode de puits (méthode indirecte)	27
7.3. Pouvoir protéolytique.....	28
7.4. Pouvoir lipolytique.....	28
7.5. Résistance aux enzymes pancréatiques (pepsine).....	28

7.6. Tolérance à l'acidité	29
7.8. Résistance aux antibiotiques	29
8. Conservation de souches.....	30
8.1. Conservation à courte terme	30
8.2. Conservation à long terme.....	30
Résultats et discussion.....	31
Discussion générale.....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographique	49
Index de milieux de cultures.....	53

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*A mon père BELLAL ABDELLAH et ma
mère TOUMI MAGHNIA*

*A mes sœurs : Amina et son fils Abdeljalil ;
Roumaysa ; Hadja ; Malek ; Khaira*

A mon frère ABDELKRIM

A mes amies

A mes collègues

remerciements

Je remercie avant tout ALLAH tout puissant ; de m'avoir guidé tout au long de ma vie ; dans toutes les années d'étude et m'avoir donné la croyance ; la volonté ; la patience et le courage pour terminer ce travail.

Je tiens à adresser ma profonde gratitude et mes vifs à toutes les personnes pour leur aide ; en particulier :

Mme .Mahmoudi. F mon encadreur ; professeur à université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem ; pour son soutien ; son aide et ses conseils qu'il m'a apportés dans la réalisation de ce travail.

Un remerciement spécial et chaleureux à Mme hafidha technicienne du laboratoire de microbiologie ;pour leur soutien ;leur compréhension et leur encouragement .

**Mme. Dr. A. laissouf , maître de conférences à Université de.Mostaganem que je remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

** Mr. Dr. Bouzned, maître de conférences à université de Mostaganem que je tiens à remercier d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Mes remerciements s'adressent aussi à :

**L'ensemble des membres du laboratoire de biologie Mr.Abaidi.A responsable des laboratoires Mr djéllali Mr.mohammed technicienne de laboratoire de microbiologie pour tout leur aide. J'oublie pas mon ami Saddaoui Mahammed pour leur aide et encouragement durant la période de réalisation de ce trav*Je remercie de façon particulière le père de microbiologie Mr. Djibaoui.R professeur à université de Mostaganem pour leur encouragement durant les années de mes études. Enfin ; je tiens remercier mes parents pour leurs aides et leurs encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.*

Liste des tableaux :

Tableau 01: La production laitière cameline par wilaya d'Algérie en 2013.

Tableau 02 : les espèces incluent dans le genre *leuconostoc* (**Hemme *et al*; 2004**)

Tableau 03 : Quelques genres de bactéries lactiques (**Bekhouche., 2006**)

Tableau 04 : Micro- organismes considérés comme probiotiques (**Hozalpfel *et al* ; 1998**).

Tableau05 : les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques

Tableau06: analyse physique de lait cru de chammelles prélevé dans la région d'Arar.

Tableau 07 : résultats s d'antibiogramme pour les bactéries lactiques

Tableau 08: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; d'acidité et le ph en milieu lait écrémé en fonction du temps de *Leuconostoc*

Tableau09: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ;d'acidité et le ph en milieu lait écrémé en fonction du temps de *Lactobacillus*

Tableau10: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ;d'acidité et le ph en milieu lait écrémé en fonction du temps de *Lactococcus*

Tableau11 : les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques

Tableau12 : représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; d'acidité et le ph en milieu lait écrémé en fonction du temps de *Streptococcus*.

Tableau13 : critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (**Sharpe ; 1981 ; Handler *et al*; 1986**).

Tableau14: principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de *Lactocoques* (**dallaglio *et al* ; .1994**)

Tableau 15 : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (**Salminen *et al.*, 2004**).

Tableau 16: spectre d'action les BAL sur les germes pathogènes et entre eux

Liste des figures :

Figure 01 : représente la race de dromadaire d'origine algérienne (*Camelus dromedarius*)

figure02 : représente la race de dromadaire d'origine Marocaine (*Camelus dromedarius*).

Figure03 : morphologie en microscopie électronique de *Streptococcus thermophilus*

figure05: résultat de test de production l'acétoïne

Figure06 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « Lactobacillales» dans la classe des « bacilli»

Figure 07: Observation au microscope électronique du genre *Lactobacillus*. Une barre représente 2µm

figure08 : résultat de test de catalase pour les BAL

Figure09 : résultat de croissance sur milieu MRS et M17 liquide

Figure10: test de citratase pour les souches lactiques

Figure 11: Résultats du test de l'ADH sur milieu M16 BCP

Figure12: les tests de croissance sur différentes (T ;NaCl ;pH)

Figure13 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (A).et en chaînette (B) selon la souche

Figure14 : observation microscopique de *Lactobacille* (a) ;*Leuconostoc* ;*Lactococcus* (c) ;*Sreptococcus* (d) .après coloration de Gram .

Figure15 : résultats de test de catalase pour les bactéries lactiques .

Figure 16 : type fermentaire des souches 1(*lactobacille*) ;2 (*Leuconostoc*) ;4 (*Lactocoques*) sur MRS contenant la cloche de durham incubées à 30°c/24h

Figure 17 : aspect macroscopique des BAL sur différents milieux de culture après 48h d'incubation

Figure18 : résultat de test de production l'acétoïne

figure19 : résultat de test de Sherman à 0.1% et 0.3% de bleue de méthylène

Figure20: test de croissance sur MRS+1%tween80

Figure21: les résultats des types fermentaire des souches lactiques Fig02 : résultats de croissance sur milieu (MRS +pepsine)

Figure22 : représente les interactions entre BAL-BAL

Figure23 : résultats d'antibiogramme pour les souches lactiques

Figure24 : image représente les interactions entre (BAL-souches pathogènes) après 24h d'incubation (méthode indirecte)

Figure25: représente les interactions entre (BAL-souches pathogènes) après 24h d'incubation méthode directe

Figure26 : résultats de croissance sur milieu MRS ou pepsine à différents pH2

Figure27 : résultat d'interaction (BAL-champignons) après 48h d'incubation

Figure28 : la résistance des souches aux milieux acides.

Figure29 : résultat de l'activité protéolytique (à gauche) et l'activité lipolytique (à droit) des BAL après 24h à 30°c

Liste des abréviations

ADH : Arginine déshydrogénase

ATB : antibiotiques

BAL: bactéries lactiques

BCP : Pourpre de bromocrésol

°C : Degré Celsius

CO₂ : Dioxyde de carbone

cm : centimètre

°D : Degrés Dornic

DO : Densité Optique

h: heurs

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

Lb: *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

min : minutes

pH : Potentiel hydroélectrique

sp : espèce indéterminée

Str : *Streptococcus*

sub specie :(sous espèce)

trs : tours

g : gramme

H₂O₂ : l'eau oxygénée

ml : millilitre

mm : millimètre

MRS : de Man Rogosa Sharpe

NaCl: chlorure de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium (soude)

OMS : organisation mondiale de la santé

spp: species

T° : température

UFC : unité formant colonie

% : pourcentage

Résumé

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomades. Ce lait se singularise néanmoins par une teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur, lié à des taux relativement élevés en Lysozyme, en Lactopéroxydase (système LP/ SCN/ H₂O₂), en Lactoferrine et en Bactériocines produites par des bactéries lactiques. Dans ce travail nous avons axé notre recherche sur le potentiel probiotique et technologique de quelques espèces de BAL isolées à partir de lait cru de chamelle de la région Adrar. Les différentes techniques microbiologiques et biotechnologiques ont été utilisées pour permettre d'identifier quatre souches (*Lactococcus lactis subsp. lactis*; *Leuconostoc mésentéroïdes subsp. mésentéroïdes*; *Streptococcus thermophilus*). Les résultats obtenus pour l'aptitude de *Str. thermophilus* et *Lc. lactis subsp. lactis* à résister aux stress acide, basique et enzymatique nous montrent clairement que cette espèce est probiotique en comparaison avec les souches les plus étudiées qui sont *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* et *Ln mésentéroïdes* et *Lc. lactis subsp. cremoris*. L'aptitude de ces souches à inhiber un large groupe de bactéries pathogènes est confirmée par les résultats d'interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes utilisées dans cette étude et qui sont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; et *Candida albicans*; *Aspergillus brasiliensis*. *Alternaria alternata*. L'antibiogramme des souches a permis de conclure que elles présentent des polyrésistances envers plusieurs antibiotiques.

Summary

For many years, camel milk has been the main food source for nomadic peoples. However, the milk is distinguished by a high content of vitamin C and niacin and by the presence of a powerful protective system, linked to relatively high levels of Lysozyme, lactoperoxidase (LP / SCN / H₂O₂ system), Lactoferrin and Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In this work, we focused our research on the probiotic and technological potential of some BAL species isolated from camel raw milk from the adrar region. The different microbiological and biotechnological techniques were used to identify four strains (*Lactococcus Lactis subsp lactis*; *Leuconostoc mesenteroids sub sp mesenteroids*; *Streptococcus thermophilus*. The results obtained for the ability of str.thermophilus and lc.lactis subsp lactis to withstand the acid, basic and enzymatic stresses that clearly show us that this species is probiotic in comparison with the most common strains. studied *Lb. casei* and *Lb. Rhamnosus* and *Ln mesenteroids* and *lc lactis sub cremoris* The ability of these strains to inhibit a large group of pathogenic bacteria is confirmed by the results of interactions between lactic and pathogenic strains used in this study. Which are *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas auroginosa*, and *Condida albicans*, *Aspergillus brinsiliensis*. The antibiogram of the strains has led to the conclusion that they have polyresistance to several antibiotics.

المخلص

يعتبر حليب النوق من وقت بعيد جدا مصدر غذاء رئيسي للقبائل البدوية. ويتميز باحتوائه على نسبة عالية من فيتامين C والنيوزين ومن خلال وجود انظمة حامية قوية، مرتبطة بمستويات عالية نسبيا من الليزوزيم في نظام LP (Lactoperoxidase / H2O2 / SCN و Bactériocines ; Lactoferrine التي تنتجها بكتيريا حمض اللاكتيك. في هذا العمل فقد ركزنا بحثنا على إمكانية probiotique والتكنولوجية لبعض الأنواع معزولة من الحليب الخام من الإبل لولاية ادرار والتقنيات التكنولوجية الحيوية والميكروبيولوجية مكنتنا من تحديد أربع سلالات (*Lactococcus lactis subsp lactis*; *Leuconostoc mesenteroids sub sp mesenteroids*; *Streptococcus thermophilus* والنتائج المتحصل عليها هي قدرة *Lc.lactis* و *Str.thermophilus* على الصمود في وجه الضغوط الحمضية الأساسية والإنزيمات التي تظهر بوضوح أن هذا النوع هو بروبيتيك بالمقارنة مع معظم السلالات المدروسة *Lb. casei and Lb. Rhamnosus and Ln mesenteroids and lc lactis sub cremoriso* لها القدرة على منع نمو مجموعة واسعة من البكتيريا المسببة للأمراض *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aurogenosa ;et Condidia albicans ;Aspergillus brinsiliensis.* وأدت تقنية AntibioGramme للسلالات إلى استنتاج أن لديهم مقاومة متعددة للعديد من المضادات الحيوية.

Introduction générale

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomade qui le consomment habituellement à l'état cru ou fermenté. Il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée, dans la plupart de ces zones pastorales sahariennes physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin, se lait se singularise néanmoins par une Teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur, lié à des taux relativement élevés en Lysozyme, en Lactopéroxydase (système LP/ SCN/ H₂O₂), en Lactoferrine et en Bactériocines produites par des bactéries lactiques. se si prolonge naturellement sa conservation de quelques jours sous des température relativement élevées. (Sbouï, 2009).

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. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi de la production du H₂O₂ (le peroxyde d'hydrogène) et des bactériocines limitant la croissance de certains germes pathogènes. Pour cela, de nouveaux produits sont développés, notamment dans le secteur laitier, Il est montré que certaines souches de bactéries lactiques, peuvent jouer un rôle bénéfique pour la santé humaine.

Les objectifs de ce travail s'articulent autour des points suivants :

- Isolement et identifications les bactéries lactiques isolés à partir lait cru de chamelle
- Études des aptitudes technologiques de ces bactéries
- Effet antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis les souches pathogènes (*Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus* ; *Condida albicans* ; *pseudomonas aeruginosa* ; *Aspergillus .sp* ; *Alternaria alternata*).

Analyse bibliographique

Chapitre01 :

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

Les bactéries lactiques et les probiotiques

1. Généralités sur les bactéries lactiques :

1.1 .Définition :

Les bactéries lactiques appelées aussi bactéries de l'acide lactique constituent un groupe très hétérogène de micro-organismes partageant divers aspects morphologiques ; métaboliques et physiologiques ; et dont la caractéristique fondamentale est la production de quantités appréciable de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme fermentaire (**Marshall *et al.* ; 1984 ; Axelsson ; 1993**) .

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes ; hétérotrophes et chimio – organotrophes. elles sont gram positives ; généralement immobiles ; asporulés ; anaérobies mais aérotolérantes (microaérophiles).elles dépourvues de nombreux activités enzymatiques comme la catalase ; 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 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**)

1.2. Habitat :

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 manière ; le lait auquel les bactéries lactiques 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**).

1.3. Taxonomie :

la taxonomie des bactéries lactiques repose sur l'identification phénotypique basée sur les tests morphologiques physiologiques et biochimiques .néanmoins ; ces méthodes conventionnelles ont leurs limites ; notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour les fonctions métaboliques. par conséquent ; les méthodes

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

1) Aperçue sur les dromadaires :

Le dromadaire occupe une place de choix dans les zones arides et semi –arides ; en raison de son excellentes adaptation aux mauvaises conditions de vie ; tels que le manque d'eau et de pâturage ; mais malgré tout cela ; il est apte à produire un lait de bonne qualité (**Mahboub et al . ; 2010**).

2) Origine du dromadaire :

Le nom « dromadaire » dérive du terme grec *dromados* qui veut dire course .il existe deux espèces : la première est *camelus dromedarius* : elle est donnée à l'espèce de chameau à une seule bosse ; appartenant au genre *camelus* de la famille des *camelidae* et dont le nom scientifique est *camelus dromedarius* ; la deuxième est *camelus bactrianus* (deux bosses). le dromadaire vit dans les régions chaudes ; arides et semi arides de la planète .il est le plus ancien fossile de *camelidae* (**Dick et al . ;2011**)

3) Taxonomie et race :

La taxonomie du dromadaire selon wilson 1984 et la suivante :

Règne :	Animalia
Embranchement :	Chordota
Classe	Mammalia
Ordre :	<i>Artiodactyla</i>
Sous Ordres :	<i>Tylopoda</i>
Famille :	<i>Camelidae</i>
Sous Famille :	<i>Camelinae</i>
Genre :	<i>Camelus</i>
Espèce :	<i>dromedarius</i>

4) Les races algériennes du dromadaire

Différentes races de dromadaires existent en Algérie et, d'une manière plus générale, en Afrique du Nord. (**Ben Aïssa ;1989**) mentionne l'existence de 9 races :

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

- 4.1. **Le chaambi** : sa répartition va du Grand Erg Occidental au Grand Erg Oriental.
- 4.2. **L'Ouled Sidi Cheikh** : on le trouve dans les Hauts Plateaux du Grand Erg Occidental.
- 4.3. **Le Sahraoui** : c'est un croisement entre Chaambi et Ouled sidi Cheikh. Présent dans le Grand Erg occidental jusqu'au Sahara central.
- 4.4. **L'Aït Khebbach** : on le trouve dans l'aire du Sud-Ouest.
- 4.5. **Le chameau de la steppe** : présent dans les limites du Sud de la steppe.
- 4.6. **Le Tergui ou race des Touaregs du Nord** : Réparti dans le Hoggar et le Sahara central.
- 4.7. **L'Ajjer** : dans le Tassili N'Ajjer.
- 4.8. **Le Reguibi** : se trouve dans le Sahara occidental de Béchar à Tindouf.
- 4.9. **Le chameau de l'Aftouh** : comme le précédent se trouve entre Béchar et Tindouf.

(2)

(1)



Figure 01 : représente la race de dromadaire d'origine algérienne (*Camelus dromedarius*)

figure02 : représente la race de dromadaire d'origine Marocaine (*Camelus dromedarius*).

5) Production laitière en Algérie :

La production laitière cameline en Algérie est estimée à 43725 litres en 2013 (anonyme ; 2013) comparés à 39668 litres en 2013 ; le tableau suivant représente en détail la production laitières des chamelles par willaya

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

Tableau 04: La production laitière cameline par wilaya d'Algérie en 2013

WILAYA	P.L	WILAYA	P.L	WILAYA	P.L
ADRAR	7759	DJELFA	1035	ILLIZI	5111
CHLEF	-	JIJEL	-	B.B.ARRERIDJ	-
LAGHOUAT	4212	SETIF	-	ELTAREF	-
O, E, BOUAGHI	-	SAIDA	-	TINDOUF	11480
BATNA	-	SKIKDA	-	TISSEMSILT	-
BEJAIA		S,B,ABBES	-	ELOUED	927
BISKRA	1440	ANNABA	-	SOUK AHRAS	-
BECHAR	5113	QUELMA	-	TIPAZA	-
BLIDA	-	CONSTANTINE	-	MILA	-
BOUIRA		MEDEA	-	AIN DEFLA	-
TEMENRASSET	14782	MOSTAGANEM	-	NAAMA	528
TBESSA	-	MSILA	-	A.TEMOUCHENT	-
TLEMCEN	-	MASCARA	-	GARDAIA	2108
TIARET	-	OURAGLA	3996	RELIZANE	-
TIZI OUZOU	-	ORAN	-		
ALGER	-	ELBAYADH	160		

PL : production laitière.

6. Lait de chamelle

6. 1. Définition :

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains , la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomade qui le consomment habituellement a l'état cru ou fermenté. il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée ,dans la plupart de ces zone pastorales sahariennes physico-chimique relativement similaire a celle du lait bovin , se lait se singularise néanmoins par une Teneur élevée en vitamine C et en niacine et par la présence d'un puissant système protecteur, lié à des taux relativement élevés en Lysozyme, en Lactopéroxydase (système LP/ SCN/ H2O2), en Lactoferrine et en Bactériocines produites par des bactéries

Chapitre II: Les bactéries lactiques et les probiotiques

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

lactiques .se si prolonge naturellement sa conservation de quelques jours sous des température relativement élevées. (Sbouï ,2009)

6.2. Caractéristiques du lait de chamelle

6.2.1. Caractères physiques et organoleptiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène (Sawaya *et al.*, 1984). Il est légèrement sucré, avec un gout acide, parfois même salé (Abdel-Rahime, 1987) et / ou amère (Ramet, 2003). Cette variabilité dans le gout est lié au type de fourrage ingéré ainsi qu'à la disponibilité en eau (Yagile *et al.* ;1980 ; Wangoh *et al.* ;1998). le pH du lait camelin se situe au tour de 6,6 et l'acidité est de l'ordre de 15° Dornic. Sa densité oscille entre 0,99 et 1,034 avec une viscosité moyenne de 2,2 centipoise (Hassane *et al.* ;1987) et un point de congélation variant de -0,53 à -0,61°C.

6.2.2. Propriétés nutritionnelles de lait de camelin :

Le lait de chamelle présente des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base. Ce lait présent des taux de protéines variant de 2.5 à 4.5% .Les teneurs en matière grasse dans ce lait sont estimés en moyenne à 3.15%. la matière grasse cameline est caractérisée par la richesse en acide gras mono –insaturé à longue chaîne (acide stéarique et oléique).le lactose constitue le sucre principal dans le lait .sa concentration dans le lait camelin varie de 2.8 à 5.8% .par ailleurs ;les grandes concentration en vitamine et en minéraux font de ce lait un véritable aliment à finalité diététique .a ce propos le lait de chamelle présente de faibles teneurs en vitamine A et B2 par rapport au lait de vache et de fortes teneurs en vitamine E et B1 dans le colostrum tandis qu'il présente un apport important en vitamine C (Siboukeur ;2012).

6.2.3. Caractéristiques microbiologiques du lait camelin :

Le lait d'un animal est parfaitement stérile quand il est traité aseptiquement ; il est normalement dépourvu de microorganismes .à la sortie de la mamelle le nombre de germes est très faible généralement inférieur à 5000 germes /ml (Anonyme ;1993).a la sortie de la mamelle ; le lait est à la température 37°C.malgré cette condition favorable à la multiplication de nombreux germes ;celle –ci est inexistante pendant les quelques heures qui suivent le traite ;en raison du pouvoir bactériostatique du lait frais .dans la mesure où l'on dispose des

Généralités sur les dromadaires et lait camelin

moyens nécessaires ;il est hautement souhaitable de profiter de cette période pour refroidir le lait afin de ralentir la prolifération des microorganismes dès la phase bactériostatique passéee (**Anonyme ;1993**).pour certaines espèces microbiennes ;le lait de chamelle constitue un bon milieu ;ce qui leur permet de s'y développer .parmi les genres appartenant qui y vive ;on cite les *Streptococcus* (ou *lactococcus*).les *lactobacillus* ;les *Leuconostocs* et les *bifidobactériums*.

Tableau 05: composition globale de lait de différents mammifères en g.100g¹-de lait

Lait	EST	MA T	Protéin es	Caséines	Urée	MG	Lactose	Cendres
Femme	12.6	-	1.6-1.2	0.5-0.8	-	3.75	6 à 7	0.21
Vache	13.0	3.9	3.2	2.8	0.014	3.9	4 à 6	0.9
Brebis	18.4	5.7	5.5	4.5	0.035	7.19	4.7	0.9
Chèvre	-	3.1	2.8	2.3	0.0385	3.38	4.4 à 4.7	0.5 à 0.8
Jument	-	-	2.0	-	-	-	-	0.4
Chamelle	12.4	-	3.00	-	-	5.38	3.3	0.7

MAT : matières azotées totales ; EST : extrait sec total (**d'après les données de Johnson et al ; 1972 ; Alais ; 1984 ; Luquet ; 1985 ; Belitz et Grosch ; 1987 ; cités par Cayot et al ; 1998**).

Les bactéries lactiques et les probiotiques

moléculaires s'avèrent indispensable car elles sont plus fiables pour une classification couvrant des niveaux d'identification allant de la famille à l'espèce. De plus, les informations obtenues avec les méthodes moléculaires sont utiles pour le concept de phylogénie (Zakhia *et al.* ;2006)

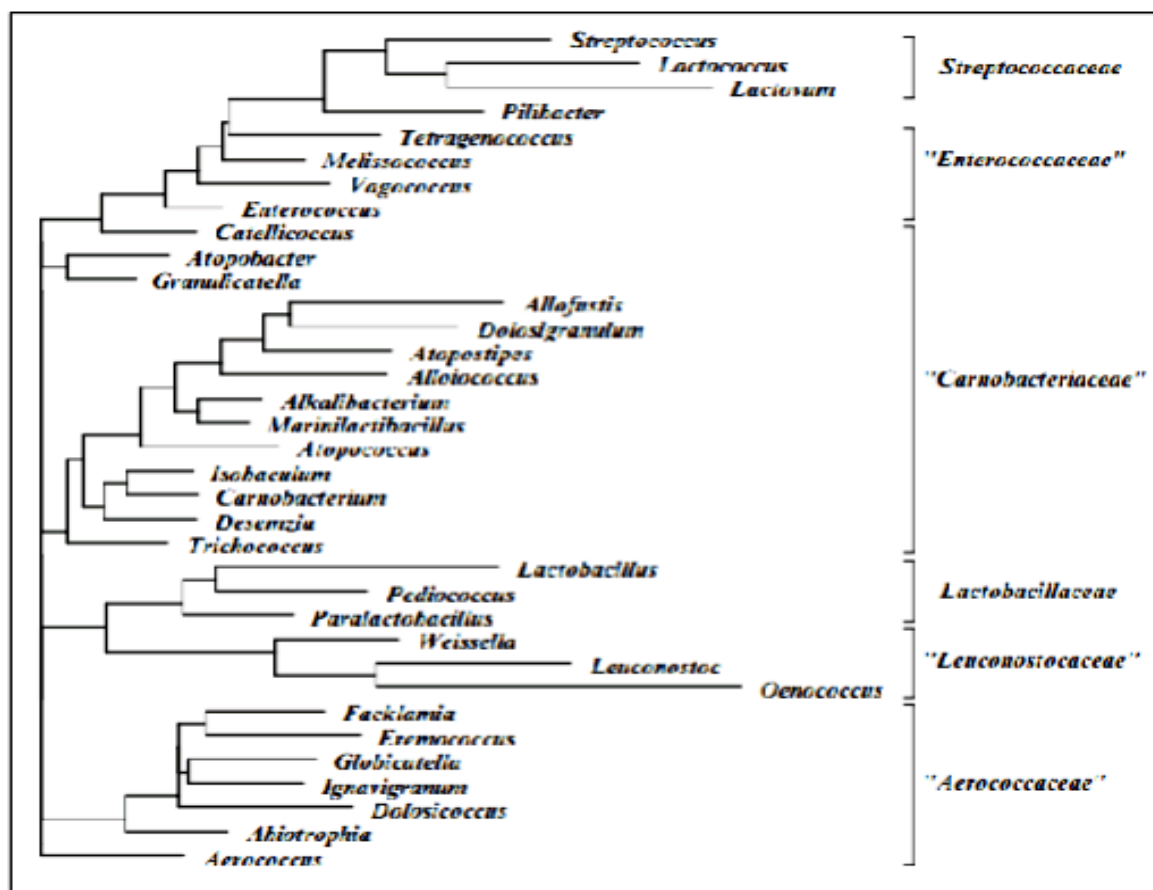


Figure03: Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *bacilli* » (De Vos *et al.*, 2009).

2. Les différents groupes des BAL :

2.1. Le genre de *Lactobacillus* :

les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de

Les bactéries lactiques et les probiotiques

se développer à moins de 15°C. Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.



Figure 04: Observation au microscope électronique du genre *Lactobacillus*. Une barre représente 2μm (Gagnon, 2007)

2.1.1. Habitat :

Les *lactobacillus* sont présents naturellement chez l'homme et l'animal et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal. Les lactobacilles sont également naturellement présents dans les aliments tels que la viande et ses dérivés ainsi les produits laitiers. Ils sont utilisés industriellement dans trois domaines :

- En tant que probiotiques dans l'alimentation animale ;
- Dans les préparations pharmaceutiques destinées à l'homme ;
- En tant que ferments lactiques pour produits fermentés (dans les domaines laitiers et carnés).

2.1.2. Classification : Leur mode de fermentation est à la base de la subdivision en trois groupes.

groupe1 :

Forme de lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate. Ce groupe comprend notamment *Lb.acidophilus* ; *Lb.farciminis* ; *Lb.johnsonii* ; *Lb.amylovorus* ; *Lb.paralimentarius* (Cai *et al.* ;1999). *Lb.delbrueckii subsp. delbrueckii* ; *Lb. delbrueckii*

Les bactéries lactiques et les probiotiques

subsp.lactis ; *delbrueckii subsp.bulgaricus* (Torriani *et al.* :1999) ; *Lb.nantensis* (Valcheva *et al.* ;2006).

Groupe2 :

Renferme les lactobacilles homofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof.il s'agit en particulier de : *Lb.alimentarius* ;*LB.casei* ;*LB.curvatus* ;*LB.plantarum* ;*LB.graminis* ;*LB.paracasei* ;*Lb.para plant rum* ;*Lb.pentosus* ;*Lb.sakei* (Stiles *et al.* ;1997). Ces espèces bactériennes sont présentes dans les végétaux fermentés comme l'ensilage et dans les produits carnés et laitiers fermentés

Groupe03 :

forme de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate ;acétate (ou éthanol) et co2.les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate.ces *lactobacillus* ont un faible pouvoir acidifiant et produisent Des substances aromatiques.il s'agit notamment de : *Lb.brevis* : *Lb.buchneri* ; *Lb.fermentum* ; *Lb.hilgardii* ;*Lb.fructivorans* ; *Lb.panis* ,*Lb.reuteri* ; *Lb.hammeseii* (valcheva *et al.* ;2005) ; *Lb.sanfranciscensis* ;*Lb.spicheri* ;

Lb.kimchii et *Lb.frumenti* (Müller *et al.*; 2000). Ces espèces se retrouvent dans les levains de panification et les produits laitiers fermentés (Oheix ; 2003).

Caractéristiques	Group I, homofermentaires Obligatoires	Group II, hétérofermentaires Facultatifs	Group III, hétérofermentaires Obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

Tableau06 : critères différentiels des trois groupes de *lactobacilles* (Sharpe ; 1981 ; Handler et Weiss ; 1986).FDP : fructose 1-6diphosphate aldolase.

Les bactéries lactiques et les probiotiques

2.2. Le genre de *Leuconostoc* :

le genre *leuconostoc* a été défini en 1878 par vanthieghem. le terme *leuconostoc* vient du mot *leucos* qui veut dire blanc ; claire ; lumière et *nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse (cyanobactérie) ; le tout fera des algues incolores (**Ogier et al. ;2007**). ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains *leuconostocs* peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les *leuconostocs* sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

2.2.1. Historique :

les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries. Or les *leuconostocs* responsables de ces accidents produisent des dextrans et en milieu saccharose ; les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique. les travaux **d'Orla –Jensen ;1919** basé sur le type de l'acide lactique produit ; l'utilisation de l'arabinose et du caractère hétéro-fermentaire par **Evans ;1918** confirmés par **Garvie ;1984** ont conduit à la séparation du genre *Leuconostoc* du *Streptococcus*.

2.2.2. Habitat :

les souches de *leuconostoc* sont présentes dans de nombreux environnements tels que la végétation verte et les racines qui constituent leur riche écologie naturelle (**Mundt ;1970**). la présence des espèces ; *Ln mesenteroides* ; *Ln lactis* et *Ln dextranum* ; a été signalée dans le lait de chamelle (**Zarour et al. ;2012 ;Chentouf et al. ;2014 ;Benmechernene et al. :2014**). ils peuvent facilement se propager dans diverses autres niches ; tels que des légumes et de l'ensilage (**Ennahar et al. ;2003**) et dans les produits alimentaires fermentés

2.2.3. Classification :

Plusieurs changements dans la classification et la taxonomie des espèces de genre *leuconostoc* ont été faits dans les dix dernières années ; et de nouvelles espèces ont été décrites le genre *Leuconostoc* comprend *Ln.mesenteroides* (avec les trois sous espèces. *mesenteroides*

Les bactéries lactiques et les probiotiques

; *dextranicum* et *cremoris*) et 13 autres espèces (tableau 07) ; *Ln.citreum* ; *Ln.carnosum* ; *Ln.durionis* ; *Ln.fallax* ; *Ln.ficulneum* ; *Ln.pseudoficulneum* ; *Ln.gelidum* ; *Ln.inhae* ; *Ln.kimchii* ; *Ln.Lactis* ; *Ln.pseudomesenteroides* (Kim et al. ; 2003).

Tableau 07 : les espèces incluent dans le genre *Leuconostoc* (Hemme et al. ; 2004)

Espèces de <i>leuconostoc</i>	Précédente nomenclature	références
<i>ln.mesenteroides</i>		Garvie(1986)
<i>Subsp.cremoris</i>		
<i>Subsp.dextranicum</i>		
<i>Subsp.mesenteroides</i>		
<i>Ln.lactis</i>		Garvie(1986)
<i>Ln.pseudomesenteroides</i>		Farrow et al(1989)
<i>Ln.carnosum</i>		Shaw et Harding(1989)
<i>Ln.gelidum</i>		Shaw et Harding(1989)
<i>Ln.citreum</i>	<i>Ln.amélibiosum</i>	Takahashi (2002)
<i>Ln.argentium</i>		Dicks et al(1993)
<i>Ln.inhae</i>		Kim et al(2003)
<i>Ln.fructosum</i>	<i>Lactobacille.fructosum</i>	Antunes et al(2002)
<i>Ln.ficulneum</i>		Antunes et al(2002)
<i>Ln.pseudoficulneum</i>		Euzbye(1983)
<i>Ln.fallax</i>		Martinez et collins(1991)
<i>ln.kimchii</i>		Kim et al(2003)

Les bactéries lactiques et les probiotiques

Tableau08 : principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de leuconostoc (Dallaglio *et al.* ; 1994).

Espèces	Croissance dans/à						Gaz a partir de glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de dextrane	Hydrolyse	
	NaCl 3%	NaCl 3%	15°C	30°C	37°C	45°C				Arginine	Esculine
<i>Ln.lactis</i>	±	-	-		+	-	+	D(-)	-	-	-
<i>Ln.mesenteroides</i> <i>ssp.cremoris</i>	-	-	+	+	-		+	D(-)	-	-	-
<i>Ln.mesenteroides</i> <i>ssp.dextranicum</i>	±	-	+		+		+	D(-)	+	-	±
<i>Ln.mesenteroides</i> <i>ssp.mesenteroides</i>	+	±	+		±	-	+	D(-)	+	-	±
<i>Ln.paramesenteroides</i>	±	±		+	±		+	D(-)	-	-	±

2.3. Le genre de *Lactococcus* :

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

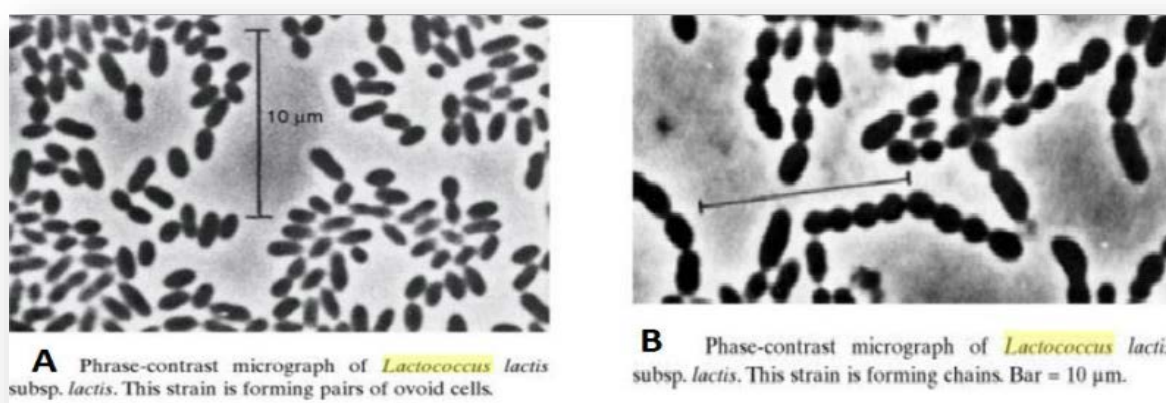


Figure05: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (A).et en chaînette (B) selon la souche (Teuber *et al* ; 2006).

Les bactéries lactiques et les probiotiques

2.3.1. Habitat :

Les habitats les plus importants de *Lactococcus* demeurent le lait ; les laits fermentés et les fromages où on les trouve en quantité dominante ; utilisés en culture pures ou en association avec d'autres micro-organismes ; ils jouent dans les produits laitiers fermentés un rôle irremplaçable pour y assurer la structure le goût ; la conservation et la salubrité.

2.3.2. Classification :

le genre *lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces.les trois espèces suivantes sont utilisées dans l'industries laitière :*Lactococcus lactis subsp.lactis* ;*Lactococcus lactis subsp.cremoris* ;*Lactococcus lactis subsp.lactis biovar .diacetylactis* (**Teuber et al. :1995**).ces sous –espèces se différencient selon certaines caractères biochimiques ;telle la production de diacétyle à partir du citrate ; la désamination de l'arginine ;la capacité à croître en présence de 4.5% de sel ;à ph 9.2 et 40°c.

actuellement ; le genre *lactococcus* comprend cinq espèces ;*Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces :*Lc.lactis subsp.lactis* ;*Lc.lactis subsp.cremoris* et *Lc lactis subsp .hordniae* (**pot ;2008**).même si *Lc.lactis* se sous- divise en quatre sous –espèces sous –espèces ;soit *Lc.lactis subsp.cremoris* ;*Lc.lactis ssp.hordniae* ;*Lc.lactis ssp.lactis* et *Lc.lactis*

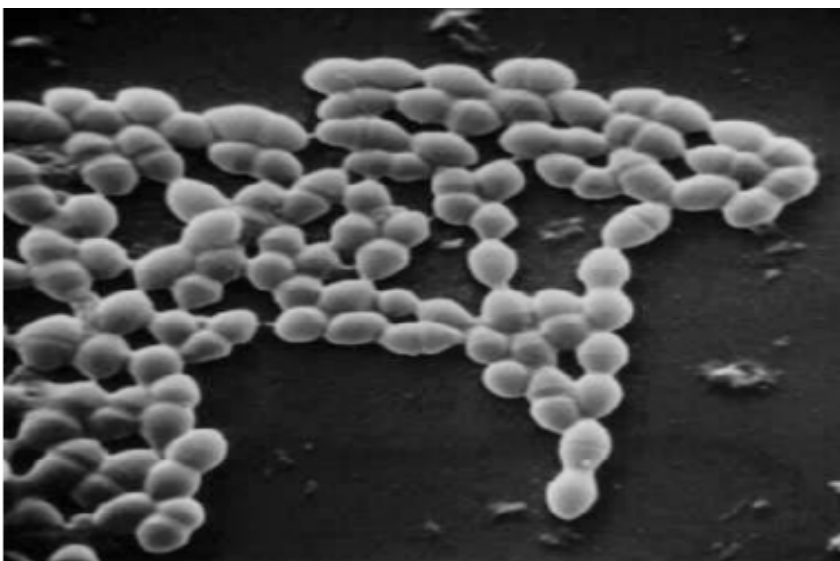
Tableau09 : principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (**Dallaglio et al .; 1994**)

Les bactéries lactiques et les probiotiques

Espèces	Croissance dans / à :					Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de :			Voges-Proskauer
	Nacl 2%	Nacl 4%	10°C	40°C	45°C			Arginine dihydrolase	α galactosidase	β galactosidase	
<i>Lc. garviae</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.cremoris</i>	+	-	+	-	-	-	L(+)	-	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.hordnae</i>	+	-	+	-		-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	v
<i>Lc.plantarum</i>		+	+	v	-	-	L(+)	-	v	-	+
<i>Lc.raffinolactis</i>		-	+	-		-	L(+)	v	+	-	+

2.4. Le genre de Streptococcus :

les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.



Les bactéries lactiques et les probiotiques

Figure06: morphologie en microscopie électronique de *Streptococcus thermophilus* (Liebefeld ; 2002)

2.4.1.Habitat et taxonomie :

Le genre *streptococcus* comprend la majorité des espèces de *Streptocoques*. ces organismes ont été un contenu en G+C de 35 à 46% (Pilet *et al.* ;2005). ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène ; oral et les autres *Streptocoques* .le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes ;hémolytiques (hémolyse β) comme *Streptococcus pyogenes* ; d'autres *Streptocoques oraux* (γ -ou non-hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*). l'espèce thermophile qui soit utilisés en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. les *Sp.thermophilus* ont été inclus dans le groupe des autre *Streptocoque* par (scheilfer *et al.*;1987). du fait par son habitat (lait et produits laitiers) ;et son caractère non pathogène seul cette espèce est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques

1) L'histoire sur Les probiotiques:

Durant plusieurs années, le terme « probiotique » a été utilisé dans différentes applications. Il a été tout d'abord utilisé pour définir des substances produites par des protozoaires pour en stimuler un autre (Lilly *et al.*, 1965) plus tard il a été utilisé pour décrire des suppléments alimentaires destinés à l'alimentation animale ayant des effets bénéfiques sur l'animal hôte en affectant sa flore intestinale (Parker, 1974). Récemment, il a été défini comme suit « organismes ou substances qui contribue à l'établissement d'un équilibre dans la microflore intestinal ». Cette définition est insuffisante car imprécise, cela inclurait les antibiotiques. Le plus judicieux serait de le définir comme « supplément alimentaire contenant des microorganismes vivants qui affecte bénéfiquement l'animal hôte en régulant l'équilibre de la flore intestinale » (Fuller, 1989). La FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : «micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère» (FAO/OMS, 2002).

Les bactéries lactiques et les probiotiques

2. Microorganismes probiotiques:

La consommation de probiotiques dans des aliments comme le yaourt date depuis plusieurs années, ce n'est que dans les années 1900 que les scientifiques ont commencé à s'intéresser sur les raisons de l'effet bénéfique qu'offrent ces complément alimentaires. Plusieurs genres bactériens et de levures sont utilisés autant que probiotiques, notamment les genres de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et *Saccharomyces*. Les bactéries probiotiques ayant des propriétés désirables et les plus documentées sont : *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* NCFG 1478, *Lactobacillus reuteri* et *Bifidobacterium animalis* Bb12 (Shah, 2007).

3) Propriétés probiotiques :

Résistance aux acides (acide gastriques)

Résistance aux sels biliaires

Stabilités en milieu acide.

Aptitude à adhérer aux parois intestinaux.

Production des substances antimicrobiennes (bactériocines)

Activité immunostimulante.

Activité antioxydant (Georges corrieu .françois *et al*; 2008).

Les bactéries lactiques et les probiotiques

Tableau 10: Micro- organismes considérés comme probiotiques (Hozalpfel *et al* ;1998)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Autres bactéries lactiques</i>	<i>Autres micro- organismes</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L.rhamnosu</i>			

4) Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :

Les BAL synthétisent des molécules à action bactéricide /bactériostatique comme les acides organiques ; le peroxyde d'hydrogène ; le dioxyde de carbone : le diacétyle ; la reutéline et les bactériocines (De Vuyst *et al* ; 1994 ; Messens *et al* ; 2002).ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

4.1. Peroxyde d'hydrogène :

Les Bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau et en oxygène .en conséquence ; l'H₂O₂ produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (Condon ; 1987).l'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (Caplice *et al.* ; 1999)

4.2.dioxyde de carbone :

Les bactéries lactiques et les probiotiques

les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobie présents dans l'aliment. toutefois ; le dioxyde de carbone peut aussi ; à faible concentration ; stimuler la croissance de certaines bactéries (**Lindgren *et al* ;1990**)

4.3. Le diacétyle :

le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arome beurre des produits laitiers. les bactéries à gram négatif ; les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries gram positif. le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine (**Motlagh *et al.* ;1991**). toutefois ; le diacétyle est rarement présents dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Caplice *et al.* ;1999**)

4.4. Les acides organiques :

Les acides organiques comme l'acide lactique ; l'acide acétique ou l'acide propionique ; sont produits par les BAL ou cours de processus de fermentation alimentaire. leurs effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (**Davison ;1997 ;Tou *et al.* ;2006 ;Djé *et al.* ;2008**). ces acides ; sous leur formes dissociée ou non dissociée ; agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomi *et al.* ;2000 ;Menasah *et al.* ;1991 ;Annan *et al.* ;1997**). l'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort ; acide faible). l'acide acétique ; par exemple ; est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures ; les moisissures et les bactéries (**Blom *et al.* ;1991**).

4.5. Les bactériocines :

La détection de la première bactériocine remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*E.coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien ; dont il a donné le nom de colicin. la découverte d'une bactériocine chez les *lactocoques* remonte à 1933. à cette époque **Whitehead ; 1933** avait observé dans un lot de lait spécifique que la présence de deux souches de *lactocoques* inhibait la croissance d'un ferment de culture fromagère. en 1953 ; Jacob *et al.* proposèrent le terme général bactériocine. les bactériocines diffèrent de la plupart des antibiotiques thérapeutiques par leur composition protéique et possèdent généralement une spécificité d'action étroite contre les mêmes espèces

Les bactéries lactiques et les probiotiques

(Tagg *et al.* ; 1976). Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant ; la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **klaenhammer ;1988** qui définit les bactériocines comme des protéines ; ou complexes de protéines ; avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice .les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire ; de leur propriétés biochimiques ; leur spectre d'action et de leur mode d'action **klaenhammer ;1988**. Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries gram-positive. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries gram-négatif n'a été décrite .en effet ; la membrane externe des bactéries gram-négatif ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne ; siège de leur activité.

5. Critères de sélection les probiotiques à application intestinal :

5.1. Critères de sécurité :

- Souche pour l'usage humain (isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits laitiers).
- Souche déposée dans une collection de culture reconnue mondialement.
- Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.
- Histoire de non pathogénicité.
- Pas de dé conjugaison excessive des sels biliaires au risque d'induire des lyses cellulaires.
- Pas de transmission possible de gène de résistance aux antibiotiques.
- Pas de dégradation excessive du tractus

5.2. Critères fonctionnels :

- Tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques.
- Tolérance à la bile et aux enzymes digestives.
- Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro-intestinal.
- Immun stimulation.
- Production des substances antimicrobiennes et antagonismes vis-à-vis des pathogènes.
- Effet sur la santé documenté

Les bactéries lactiques et les probiotiques

5.3. Critères technologiques :

- Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.
- Conservation des propriétés probiotiques après production (**Mattila *et al.* ; 1999 ; Sarrela *et al.* ;2000**)

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie (faculté des sciences de la nature et de la vie , département de biologie) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Durant la période (janvier– Mai).

1. Milieux de culture :

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

MRS à pH9 ; MRS à pH 4.5; MRS à pH6.5; MRS à pH 6.8; MRS à pH5.4; MRS +6.5% NaCl;MRS+4.5%NaCl ; MRS+18%NaCl ; MRS +30µg vancomycine (MRSV); MRS +10% lait écrémé (MRSL); MRS +1% tween80 ; M17 à ph 6.8; M17 à ph6.2 ; MRS a base de jus de tomate ; MSE ; MRSBCP ; M16BCP ; KMK ; ; MH; MRS a base de jus de tomate

MRS liquide +; M17 liquide ; bouillon nutritive ; Clark et Lubs .

2. Echantillonnage :

Le lait de chamelle testé dans cette étude provient de région Ouled Ahmed Timmi de Adrar ou mois de février Après collecte des échantillons, 3flacons de lait ont été met en glacier à 4°C jusqu'à leur utilisation (nous avons travaillé dans des conditions aseptique)

3. Provenance des souches bactériennes:

Les bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Pseudomonas aeruginosa* , *condida albicans* ATCC10231 proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire d'Oran. *Pseudomonas aeruginosa* provient de laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem.La flore fongique (*Alternaria alternata* et *Aspergillus brinsiliensis*) proviennent de laboratoire de l'université de Mostaganem.

4. Paramètres organoleptiques et physique de lait cru de chamelle :

La mesure du pH a été réalisée par un pH-mètre. L'acidité totale a été déterminée en titrant 10 ml de lait cru de chamelle avec la solution basique NaOH N/9 en utilisant l'indicateur de pH la phénolphtaléine.

5. Isolement et purification des bactéries lactiques

Les échantillons de lait dilué (10^{-1} à 10^{-4}) dans l'eau physiologique (9‰ NaCl) ont été ensemencés par étalement sur gélose MRS acidifiée (pH 5.4) pour les lactobacilles et M17 pH 6.5 (lactocoques); et ensuite incubés à 30°C pendant 24h à 48h. Des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse ont été récupérées au hasard sur lesquelles ont été appliqués un test préliminaire comprenant la coloration de Gram et le test de catalase. Seules les souches à Gram positif et catalase négative ont été prises en considération puis purifiées par ensemencements successifs en stries. Pour l'isolement de lactobacilles nous avons utilisées MRS modifié (sans KH_2PO_4) se qui nous permet d'obtenir des forme de bacille sans passé par les étapes de purification contrairement aux autres souches.

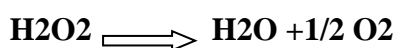
6. Purification et ré-identification des espèces :

6.1.Examen macroscopique : La morphologie des colonies et leur dimension sont étudiées à partir des cultures obtenues sur les milieux suivants : la gélose MRS et la gélose M17 ;MSE ;MRSV

6.2.Examen microscopique : Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures, puis fixé et coloré par **la méthode de Gram** (voir l'annexe).

6.3..Recherche de la catalase :

La catalase (Ferro porphyrine de poids moléculaire élevé) à la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne. On prend une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase(**Garnier et Denis, 2007**)



6.4Test de croissance à différentes température et de thermorésistante:

Ces tests nous permettent d'évaluer l'aptitude d'une espèce bactérienne à croître dans une large gamme de températures. En ensemence de la suspension bactérienne dans un milieu MRS à pH 6.8 et on incube les tubes à 20°C, 30°C ; 37°C ; 40°C et 45°C. La

Matériel et méthodes

lecture des résultats ce fait après 24h pour les deux derniers et pendant une semaine pour le test de 20°C. Pour la thermorésistance, on fait chauffer la suspension bactérienne pendant 30 min à 63,5°C puis en incubé à 30°C et à 53.5 pendant 15mn (**Bottazzi, 1988 ; De Roissart *et al.*, 1994**

6.5. Test de croissance à différentes concentrations de NaCl:

On utilise pour ce test des milieux MRS hypersalé à 4.5% ;6.5% ;18% ; de NaCl dans lesquels on ensemence la souche bactérienne. Il nous permet de déterminer la résistance de la dite souche au stress halin (**Larpent *et al.*, 1990 et Samelis *et al.*, 1994**). On apprécie la croissance par l'apparition d'un trouble.

6.6. Test de croissance à différentes pH :

On utilise pour ce test des milieux MRS à différentes pH (4.5 ; 5.4 ; 6.5 ; 6.8 ; 7 ; 9.6), on apprécie la croissance par apparition d'un trouble

6.7. Test hydrolyse arginine l'ADH:

Le test consiste en un ensemencement de la souche sur un milieu M16 BCP solide à pH 7. 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**).

6.8. Test de production l'acétoïne

la mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation par la voie du butane-diol en présence de réactif VP (en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2), l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné. La lecture s'effectue après quelques minutes.

6.9. Utilisation de citrate :

Utilisation du citrate est détectée sur le milieu kempler et MC Kay 1980.après l'incubation à 30°c pendant 24h à 48h ; les colonies qui fermentent le citrate sont des colonies bleues ou ayant un centre bleu (citr⁺)les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (citr⁻).

6.10. Production de dextrane.

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (**Mayeux et al., 1962**). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant aussi de différencier entre les leuconostokes productrices et non productrice de dextrane.

6.11. Vancomycine-résistance :

Seuls les isolats de genre leuconostoc ont été testés pour la résistance à la vancomycine. elle est mise en évidence par la culture sur milieu MSE (**Mayaux et al. ;1962**) gélosé à une concentration de vancomycine égale 30µg. l'ensemencement est réalisé à la surface et les boîtes sont incubées à 30°c pendant 48h.

6.12. Test de type fermentaire :

Les souches sont ensemencés dans un bouillon M17 ou MRS contenant les cloches du Durham, puis incubés à 30°C/24h. L'absence de gaz dans les cloches montre qu'il s'agit d'un métabolisme homofermentaire alors que la présence de gaz indique qu'il s'agit d'un métabolisme hétérofermentaire.

6.13. Test d'utilisation des sucres :

Les cultures bactériennes revivifiés sur MRS subissent une 1ère centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min après élimination de surnageant, 5ml d'eau physiologique stérile ajouté au culot puis une 2ème centrifugation suivie de l'ajout de 5ml d'eau physiologique stérile au culot bien agité au vortex pour obtenir une suspension homogène. Bouillon MRS ou M17 sans sucre + le pourpre de bromocrésol (0,025g/l) repartit dans des tubes à raison de 10 ml par tube. Dans chaque tube en met quelque goutte de suspension bactérienne +quelque goutte de sucre testée. On crée l'anaérobiose par l'addition de l'huile de paraffine stérile à la surface puis incubés 30°C/24h à 72h. L'utilisation des sucres se traduit par un virage de l'indicateur colorée (virage au jaune). Les sucres étudiés sont : Glucose, D(-) fructose, D(-) arabinose, D(+) galactose, lactose, maltose, cellulbiose, mannitol, amidon, saccharose(**BOUMEDIENE Karima ;2012**). Les solutions sucres sont préparées à 3% et stérilisées par autoclavage.

6.14. Test de lait de Sherman :

ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleue de méthylène à différentes concentrations. chaque culture à tester a étéensemencée dans écrémé au bleue de méthylène à 0.1% et 0.3%. après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h ; on note les observations relatives à la réduction de bleue de méthylène et la coagulation du lait la réaction positive se traduit par la réduction de bleue de méthylène qui vire du bleu (forme oxydée) vers le transparent : forme réduite (*Maghnia ; 2011*).

7. caractérisation technologiques :

7.1. pouvoir acidifiant ;

7.1.1. étude de la cinétique :

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

Chaque souche a étéensemencée d'abord sur milieu MRS liquide et incubée à 30 pendant 18h ; ensuite 100µl de la culture jeunes a été inoculé dans un tube contenant 10ml de lait écrémé et incubée à 30°C. En retirant les deux tubes de t_0 . les 24 tubes restant vont être incubée à 30°C . chaque deux heures deux tubes vont être sortis pour suivre l'évaluation de l'acidité et de pH (*kihal et al 2007*)

7.1. 2. Mesure de pH :

L'acidité développée dans le lait est suivie aussi par une mesure de pH à l'aide d'un pH mètre type CRISON

7.1.3. L'acidité titrable :

le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait est effectué selon la méthode décrite par (*acools et al. ; 1977*) en utilisant un statif avec noix et pince ; une solution de NaOH/9 ; une burette de 25ml ; une pipette de 10ml et une solution de phénolphthaléine à 1% dans l'éthanol. On remplit la burette de la solution de NaOH ; on la fixe au statif et on régle le niveau du liquide à zéro. les tubes incubés contenant les cultures de lait ; sont versés dans un bécher dans lequel sont ajoutées 5 gouttes de phénolphthaléine . le titrage s'effectue sous agitation . on considère que le virage atteint ;

Matériel et méthodes

quand la couleur blanche du lait vire au rose pale et persiste pendant une dizaine secondes.les résultats sont exprimés en degrés dornic selon la formule suivante :

Acidité (°d)=VNaOH ×10 VNaOH : volume de NAOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait .1degré Dornic =1°D=0.1g d'acide lactique dans un 1l de lait.

7.1.4. Etude de la cinétique de croissance en milieu lait:

Nous avons respecté la même comparaison concernant les milieux lait pour l'étude de la cinétique de croissance ainsi que la même méthodologie d'ensemencement, la seule différence est que toutes les 2h on effectue des dilutions de l'ordre de 10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ que l'on ensemence en profondeur sur milieu MRS. On ensemence deux boites par dilution pour être conforme à la méthode de dénombrement en milieu solide (**Kihal et al., 1996**).

7.2. Etude l'activité antimicrobienne des souches :

Les bactéries lactiques isolées sont testées pour leur activité antagoniste selon deux méthodes :

7.2.1. Méthode de double couche (méthode directe):

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition ;les souches lactiques ont été ensemencées en touches à la surface d'un milieu MRS ou m17 solide à partir d'une culture de 24h ;les boites sont séchées sous la température ambiante pendant 2h.après 24h incubation chaque spot est recouvert avec une goutte de gélose nutritive cela permet de fixer les colonies et éviter leur dispersions (**Larpen –Gourgaud et al. :1997**), une couche de gélose MH semi solide contenant 0.1ml d'une culture en milieu liquide de 18h d'une couche indicatrice (pathogène)est coulée au dessus de la première couche de gélose.la lecture des boites s'effectue après 24h d'incubation à37°c en aérobiose ;les souches présentant une zones transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes .la taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm la méthode a été expliqué dans le tableau05.

7.2.2. Méthode de puits (méthode indirecte)

afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par nos bactéries lactiques ;il est impératif de réaliser une série de tests on utilisant la méthode indirecte

Matériel et méthodes

.cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des souches lactiques productrices de substance antimicrobienne avec la souche test (**Tagg *et al* ;1971**).les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test .les souches sont cultivé dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures .après (incubation ;le milieu est centrifugé 8000rpm/10min)et le surnageant est conservé. Dans une boîte de pétri contenant du milieu solide et ensemencé par la souche test .des puits sont réalisés avec un emporte pièce et celée par 10µl de gélose mh.les puits recevront 100µl du surnageant des souches lactiques (**Khaoua *et al* .; 1997**)ensuite les boîtes sont incubée pendant 24 à 48h. le résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la souche productrice .

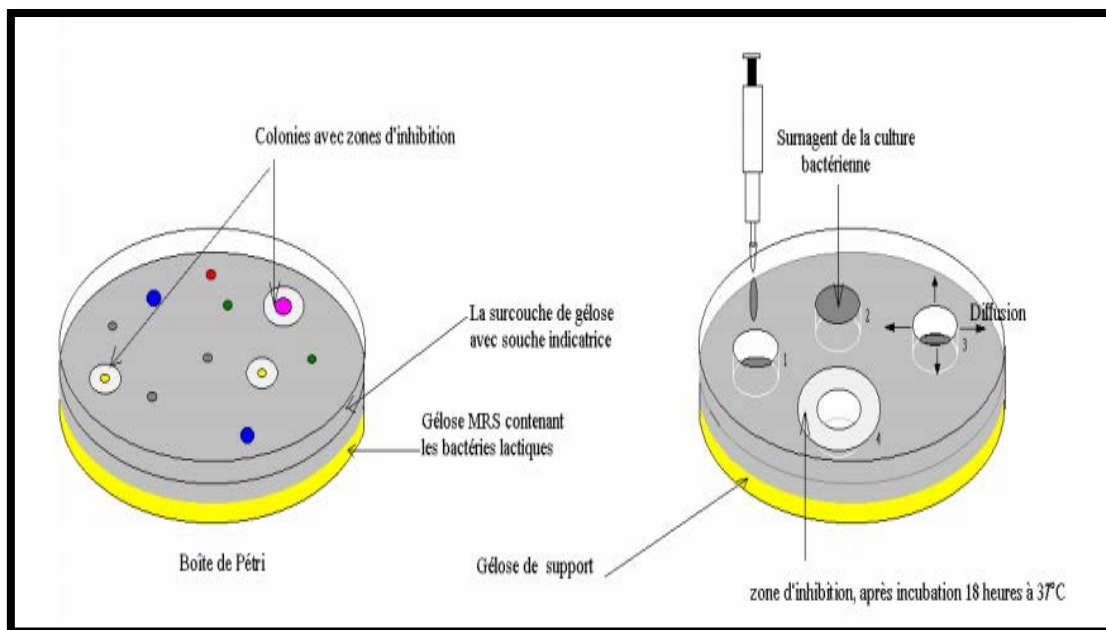


Figure 07 : Les différentes méthodes utilisées pour recherche la nature de substance antimicrobiennes

(1) méthode directe ;(2) méthode indirecte.

7.3. Pouvoir protéolytique :

L'activité protéolytique des BL est recherchée en milieu MRS gélosé additionnée de lai écrémé à 1% et 2% selon la méthode de (**Van Den Berg *et al*. 1993**). Les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface de milieu de culture jeune .après une incubation à 30°c/24h ;la protéolyse est révélée par des zones claires autour des touches .

7.4. Pouvoir lipolytique :

l'activité lipolytique est étudiée sur milieu décrit par Sierra 1957 pour détecter la production des enzymes lipolytiques dans lequel la monooléate sorbitane polyoxyéthylène (tween80) est utilisé comme substrat lipidique (Sierra ;1957 ;Janda ;2005). Les souches bactériennes à tester sont ensemencées simultanément en touches à la surface de milieu de culture jeune .après une incubation à 30°c/24h ; la lipolyse est révélée par des zones claires autour des touches.

7.5. Résistance aux enzymes pancréatiques (pepsine):

l'action antimicrobienne de la pepsine qui est une enzyme sécrétée par l'estomac ;constitue la deuxième barrière biologique contre les éléments intrus ;ainsi qu'à la survie des bactéries dans le tractus intestinal .les cellules bactériennes d'une culture jeune ont été récupérées par centrifugation (4000 tpm/10min)le culot a été rincé par PBS à pH8.après une autre centrifugation ;les cellules bactériennes ont été mises dans du PBS à pH2 et pH3 additionné de 3 mg/ml de pepsine (Hosseini *et al.* ;2009).

La résistance des souches à la pepsine est estimée par mesure de la densité optique à 660nm et dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution ; après les 3h d'incubation t_{3h}. Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{UFC à } t_{3h} / \log \text{UFC à } t_{0h} \times 100$$

7.6. Tolérance à l'acidité :

l'aptitude des souches à résister à l'acidité gastrique a été déterminer selon la technique décrite par (Hydrominus *et al* ;.2000) avant de réaliser ce test ;chaque souche a été préparée en triple par culture jeunes de bouillon MRS le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000rpm/4min ; Puis les cellule ont été suspendues dans 10ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs de pH (pH2 ;pH3 ;pH7).la densité optique DO 660 de chaque culture et le nombre de cellules viables ont été déterminés à temps zéro(t_{0h}).les tubes ont été incubés pendant 3h à30°c. La résistance des souches à facteur hostiles est estimée par mesure de la densité optique à 660nm et le dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution ; après les 3h d'incubation (t_{3h}).le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie(\%)} = \log \text{UFC à } t_{3h} / \log \text{UFC à } t_{0h} \times 100$$

Matériel et méthodes

7.7. Résistance aux antibiotiques :

pour réaliser ce test ;la méthodes de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée ;chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO₆₆₀ varie entre 0.08 et 0.1 puis les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'écouvillon .chaque boîte récent même disques d'ATB (**tableau01**) .après incubation à 37°c/24h.les résultats ont été exprimé comme(S) sensibles ;et résistantes(R) selon les normes recommandées (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie ;2007) (**Leroy et al. ;2007**).

Les antibiotiques	Les symboles	Quantités(µg ou U/disques
Pénicillines (G)	P	10u
kanamycine	K	30mcg
cephazoline	CZ	30mcg
nitroxoline	NTX	30u
bacitracine	B	10u
sulfamide	SSS	30µg
acide nalidixique	NA	30 µg
péfloxacine	PEF	10u
cefotétan	CT	30µg
Netilmicine	NET	30ug

Tableau 11: les différentes ATB utilisés

8. conservation les souches

8.1. Conservation à courte terme :

La conservation à courte terme des souches pures a été effectuée sur milieu MRS et M17 incliné après croissance à la température appropriée 30°c.les culture ont été maintenues à 4°c et un repiquage a été faite toutes les 3 semaines pour les maintenir en vie (**Saidi et al, 2002**).

8.2. Conservation à long terme :

Pour une conservation à long terme, les cultures pures sont centrifugées à 5000 trs/min pendant 5 min, elles sont lavées au l'eau distillée puis recentrifugées à 3000 trs/min

Matériel et méthodes

pendant 3 min. Les culots sont maintenus en suspension dans un milieu contenant 10% de lait écrémé (enrichie par 0,05% d'extrait de levure) et 30% de glycérol déposées à une température de (-20°C). Au fur et à mesure des besoins, les cultures sont décongelées rapidement et repiquées dans du lait deux fois avant l'utilisation (**Samelis *et al*, 1994**).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1) Paramètres organoleptiques et physique des échantillons du lait camelin :

Les échantillons ont été une couleur blanche opaque avec une saveur sucré les résultats de caractéristiques physiques ont été obtenues dans tableau 12

Tableau12: analyse physique de lait cru de chamelles prélevé dans la région d'Arar.

paramètres	échantillon01	échantillon02	échantillon03
Température	20	20	20
pH	6,7	6,6	6,5
Acidité dornic (D°)	18,5	16,5	19,5

2) Identification des isolats

Après les séries de purification sur milieu solide et liquide (MRS ou M17), les colonies des souches présentent les caractéristiques suivantes, la croissance en milieu liquide est caractérisée par l'apparition du trouble bas du tube

Lors de cette étude nous avons identifié les souches *lactobacillus* ;*streptococcus* ;*leuconostoc* ;*lactococcus* isolées à partir du lait de dromadaire par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques ; physiologiques et biochimiques .Tous les isolats gram positif ; catalases négatifs sont étudiées.

2.1.) Critères morphologiques :

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

2.1.1) L'examen macroscopique : se fait sur différentes milieux du culture (MRS ; M17 ; MSE :MRSV) .les résultats sont démontrés dans le figure 08 .nous avons obtenues des colonies circulaire ; bombées et de couleur blanche ; leur taille est d'environ 1mm à 2mm de diamètre et d'autres colonies irrégulière ; érodée ; de couleur crème et de 1à3mm de diamètre figure 08 (Kihal, 1996 ; Carr *et al.* ; 2002).

2.1.2) Examen microscopique : après coloration de gram nous avons obtenues quatre formes de cellules :

Résultats et discussion

1. Des coques en paires (diplocoques) et en chainettes.
2. des coques mais allongée en paire (diplocoques).
3. des bâtonnets en petite taille.
4. des coques en amas et en longues chaines.

D'après les travaux (**Zadi-karam *et al.* ;2005**) ont identifié les BAL du lait de chamelle et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles *lactococcus sp* ;*leuconostoc sp* ;*lactobacille sp*

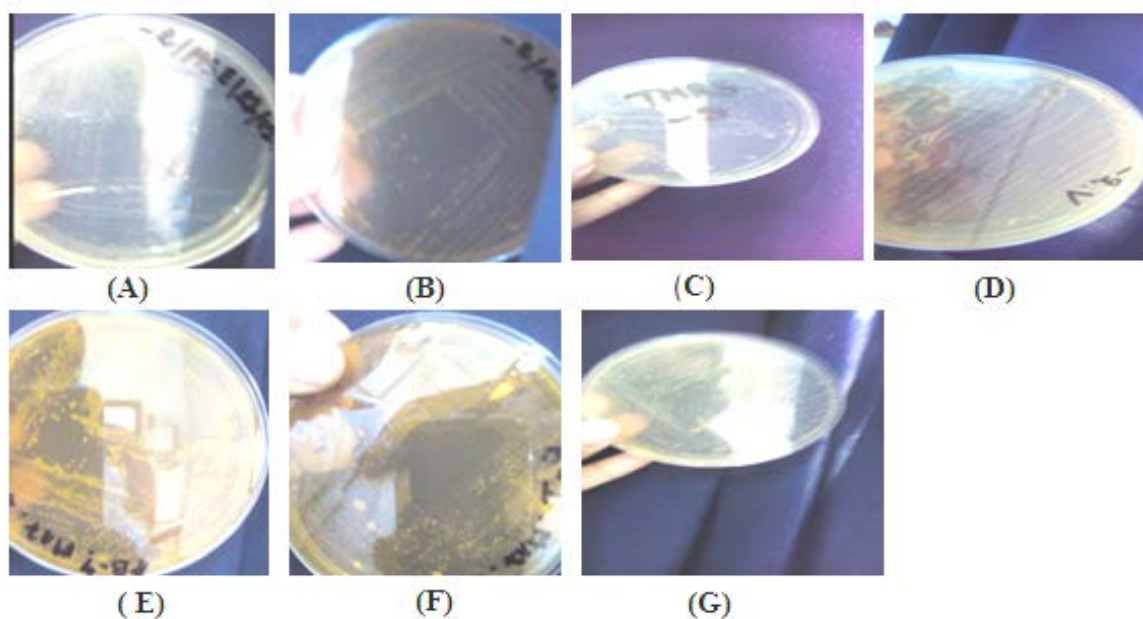


Figure 08 : aspect macroscopique des BAL sur différents milieux de culture après 48h d'incubation à 30°C. (A) *leuconostoc* sur milieu MSE ; (B) *leuconostoc* sur milieu MRS ; (C) *leuconostoc* sur milieu MRS a base de jus de tomate ; (D) *leuconostoc* sur milieu MRSV ; (E) *lactobacille* sur milieu MRS ; (F) *lactocoques* sur milieu M17 ; (G) *lactobacille* sur milieu MRS sans KH₂PO₄ après 48h d'incubation)

Résultats et discussion

2.2) Ré-identification des espèces lactiques:

2.2.1) Test de catalase :

tous nos résultats sont catalase négatives ce qui est caractéristique des BAL ; résultat a été démontré dans la figure 09



figure 09 : résultat de test de catalase pour les BAL

2.2.2) Coloration de Gram :

La coloration de Gram montre que toutes les souches sont de Gram positif et de forme bâtonnet ou coque, ou regroupées en paire ou en chaînette les résultats ont été résumés dans la figure 10

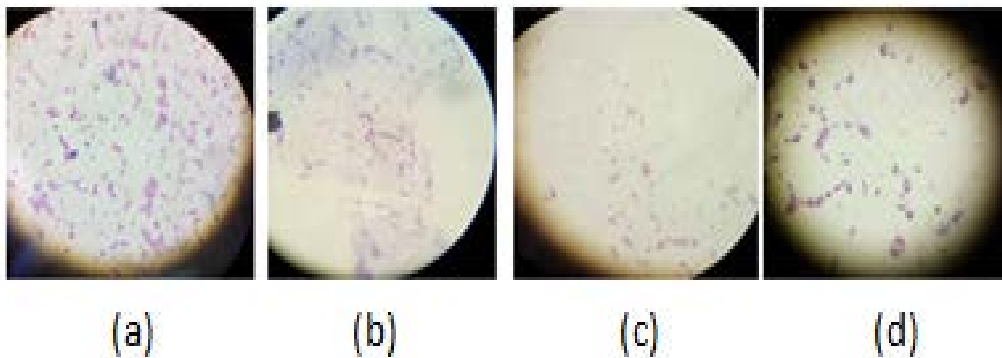


figure 10: observation microscopique de *lactobacille* (a) ; *leuconostoc* (b) ; *lactococcus* (c) ; *streptococcus* (d) après coloration de Gram.

2.2.3) Type fermentaire :

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaire et les souches hétérofermentaire. il y a trois souches homofermentaire (ne produisent de CO₂) à partir du glucose et une souche hétérofermentaire (produisent de CO₂) qui apparaît dans cloche de

Résultats et discussion

durham caractère spécifique pour les *leuconostoc* (Mathol *et al.* ; 1994 ;Badis *et al.* :2005). Les résultats obtenus sont présentés dans figure11



Figure 11: type fermentaire des souches (*lactobacillus* ; *Leuconostoc* ; *streptococcus* ;*Lactococcus* sur MRS contenant la cloche de durham incubée à 30°C/24h

2.2.4) Recherche de l'arginine Dihydrolase ADH :

L'apparition d'une coloration jaune : réaction négative et on d'autre part l'apparition de couleur violet résultats positive.; trois souches n'hydrolysant pas l'arginine et une souche hydrolyse l'arginine. Les résultats obtenus sont indiqués dans le figure12 .

2.2.5) Dégradation de citrate :

Pour le test de citratase : Tous nos isolats fermentent le citrate (donnent la couleur bleue) dans milieu KMK c'est-à-dire réaction positive ; les résultats ont été obtenues dans le figure13.



Figure12: test de citratase pour les souches lactiques (1)*Lactobacillus*;(2) *leuconostoc* ;(3) *streptocoque* ;(4) *lactocoque* (à droit)

Figure13: Résultats du test de l'ADH sur milieu M16 BCP (à gauche)

Résultats et discussion

2.2.6) Test de croissance a différents Temperature ;pH ;NaCl :

2.2.6.1. La croissance en milieux acide :

Les résultats montrent que toutes les souches (*Lactobacillus* ;*Streptococcus* ;*Leuconostoc* et *Lactococcus*) poussent à pH4.5 et pH6.5 .les résultats ont été obtenues dans le figure14

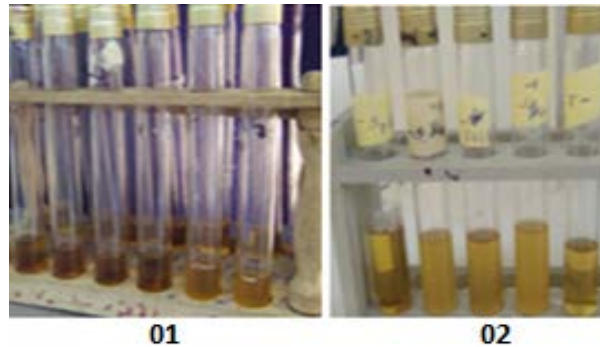


Figure 14: test de croissance à (01) :pH4.5 +pH5.4 ; (02) :pH9

2.2.6.2. La croissance au milieu hypersalé

Tous les souches poussent a ces concentration de NACL (4.5% et 6.5%).en contraire tous les souches ne poussent pas au milieu halin a18%NACL .les résultats ont été obtenues dans le figure15.

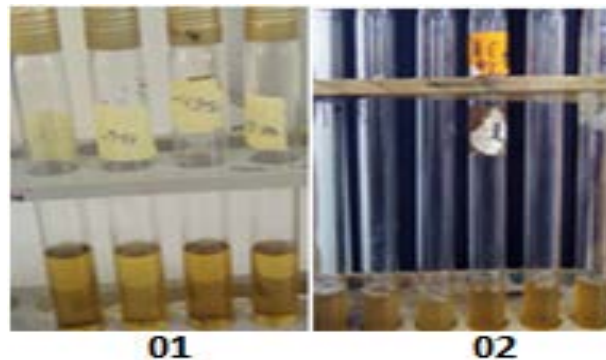


Figure15: résultat de test de croissance à 4.5%NaCl ; 6.5%NaCl et 18%NaCl

2.2.6.3. La croissance à différentes température :

Nos souches n'ont pas poussé ni à 4°C ni à 45°C sauf une souche de *streptococcus* (BL3) ne pousse pas à 20°C mais il pousse à 45°C cependant elles ont poussée à 20°C et 40°C .les résultats ont été obtenues dans le figure16.

Résultats et discussion



Figure 16: test de croissance à différente température (20°c ;30°c ;40°c ;45°c)

2.2.6.4. La thermorésistance :

Aucune souche n'a été résisté à 63.5°c /30min mais tous les souches ont été résisté à 55°c/30min.souf la souche de *lactobacillus* les résultats ont été obtenues dans le figure 17.

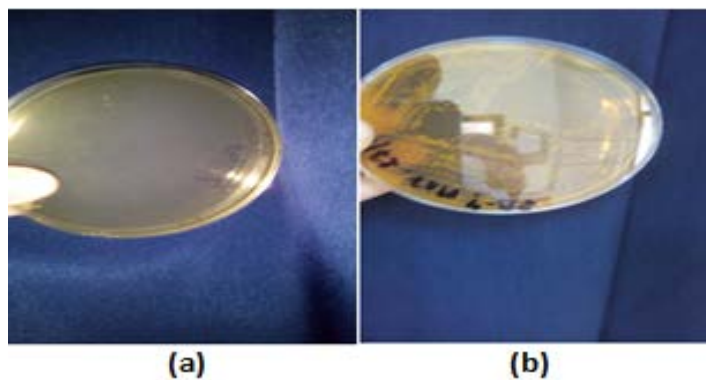


Figure 17 : (a) résultats de résistance 63.5°c /30min ;(b) résultats de résistance 55.5°c après 24h d'incubation.

2.2.7)La production d'acétoine :

La production d'acétoine a été effectuée sur le milieu clark et lubs ;elle se manifeste par l'apparition d'un anneau rose –rouge sur la culture après l'addition des deux réactifs.NAOH et l'alpha-naphtol .nous avons observés l'absence de l'anneau rouge :réaction négative .tous les isolats ne produisent pas de l'acétoine.les différents résultats sont démontrés dans le figure 18

Résultats et discussion

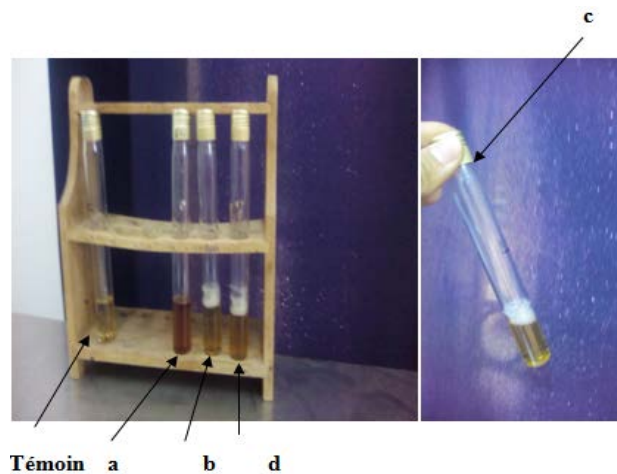


Figure18 : résultat de test de production l'acétoine **a** :*Lactobacille* ; **b** :*leuconostoc* ; **c** :*Streptocoque* ;**d** :*Lactocoque*

2.2.8) Lait de Sherman

Le bleu de méthylène est d'une couleur bleue en milieu très oxydant incolore en milieu réduit. Après l'incubation Dans le lait de Sherman pour 0.1% et 0.3% bleu de méthylène ; il ya une forte coagulation observés chez tous les isolats dans le milieu de lait de Sherman mais il n'y pas de réduction de bleu de méthylène qui justifier par l'absence de décoloration de milieu c'est de réaction négative les résultats ont été obtenues dans le figure19

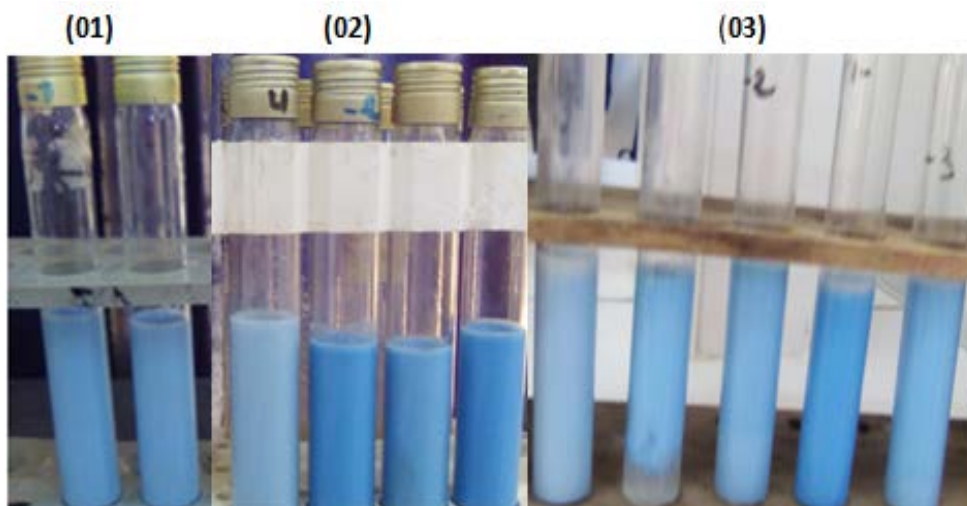


figure19: résultat de test de Sherman à 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène. **(01)** témoin ;**(02)** pour 0.3% bleu de méthylène. **(03)** pour 0.1% bleu de méthylène.

Résultats et discussion

Tableau13: les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches lactiques.

	<i>Lactobacille</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Strptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
Gram	+	+	+	+
catalase	-	-	-	-
forme	petite bacille	Des coques	Des coques	Des coques
Mode d'association	Diplo/ chaînette	Diplo	Longues chaînes	Diplo/ chaînette
pH4.5	+	+	+	+
pH5.4	+	+	+	+
pH6.5	+	+	+	+
pH9.6	+	-	-	+
4.5%NaCl	+	+	+	+
6.5%NaCl	+	+	+	+
18%NaCl	-	-	-	-
0.1%BM	-	-	-	-
0.3% BM	-	-	-	-
ADH	-	-	+	-
Cit	+	+	+	+
Homo/Hété	Homo	Hétéro	Homo	Homo
dextrane	-	+	-	-
VP	-	-	-	-
T=20°c	-	+	-	+
T=30°c	+	+	+	+
T=37°c	+	+	+	+
T=40°c	+	+	+	+
t=45°c	-	-	+	-
63°c/30mn	-	-	-	+
55°c/15mn	-	+	+	+
RV	-	+	-	-

(+) : bonne réaction ;(-) : pas de croissance (pas de réaction); **RV** : Résistantes - Vancomycine ; **BM** :Bleue de Méthylène ;**Cit** :citratase ; **diplo** : diplocoques

Profil de fermentation des sucres :

L'utilisation des sucres se traduit par un virage de l'indicateur colorée violet vers au jaune c'est réaction(+) et le réaction (-) reste jaune les résultats ont été expliqués dans figure15.Tous nos isolats fermentent glucose ; lactose galactose et fructose ; et ne pas fermentent l'amidon et glycérol. il ya trois souches incapables de fermenter adonitol ces le genre de *leuconostoc* ; *strptococcus* et *lactococcus* et deux souches incapables de fermenter xylose c'est le genre de *leuconostoc* et *streptococcus* ainsi une genre incapable de fermenter maltose c'est *lactococcus* (tableau13), les résultats ont été montrés aux figures (voir annexe04)

Résultats et discussion

Tableau 14: résultats des profils fermentaire des bactéries lactique

	<i>Lactobacille</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
témoin	-	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-
Fructose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+
Xylose	+	-	-	+
Galactose	+	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+
saccharose	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-
glucose	+	+	+	+

Les tests morphologiques et physiologiques permettent de différencier 4 espèces bactériennes. Par rapport au test de l'ADH ; croissance à différentes température ;NaCl ;pH la production l'acétoïne ;l'utilisation de citrate et le profil fermentaire des sucres ;ils ont été subdivisés en espèces et sous-espèces (**Badis. ;2004 ;Dicks *et al.* ;1993 ;Hammes *et al.* ;1992 ;Holzapfel et Schillinger 1992 ;Harrigan *et al.* ;1976**).

Espèce01 :ADH- ; ne produisent pas l'acétoïne ; elle pousse à différente températures (20°C à 40°C) mais pas à température 45°C. Cette souche supporte différente concentration de NaCl (4.5% ; 5.4% ; 6.5%);elle fermente les sucres suivants (Adonitol ; Fructose ; Maltose ; Lactose ; Xylulose ; Galactose ; Mannitol ; Saccharose et Glucose).et elle ne fermente ni l'amidon ni Glycérol. Cette souche peut s'apparenter à *lactobacillus plantarum* d'après les travaux de (**sharpe ;1979 ;balows *et al.* ;1991**)

Espèce02 :la souche est ADH- ; citrate+; ne produire pas de l'acétoïne ;elle produit le CO₂ à partir de glucose ;elle ne pousse ni à 4°C ni à 45°C, en présence de 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène. cette souche résiste à 30µg de vancomycine, et sur milieu MSE elle produit de dextrane, elle fermente les sucres suivants : Fructose ; Maltose ; Lactose ; Galactose ; Mannitol ; Saccharose et Glucose et elle ne fermente pas l'amidon ; glycérol ; xylulose ; et Adonitol .Cette souche peut s'apparenter à *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*; Mêmes résultats ont été trouvés par Garvie(1979) ; Wang *et al.* 2013 et Danilovic *et al.* (2014). Les résultats sont semblables aux travaux de (**Ogier *et al.* ;2008 ;khedid *et al.* ;2009**). **Holt *et al.* ;2001 ;Arguello-Morales *et al.* ;2005**).

Résultats et discussion

Espèce03 : la souche est ADH+ ; citrate+; ne produire pas de l'acétoine ; pousse à 20°c et 45°c. Elle fermente le fructose ; maltose ; lactose ; galactose ; mannitol ; saccharose et glucose.et ne fermente pas l'amidon ; glycérol ; xylulose ; et Adonitol .Cette souche peut s'apparenter à *Streptococcus thermophilus* ; Selon les données de la souche de références de **Bergy's et manual (2009)**.

Espèce04 : la souche est ADH- ; citrate+ ne produire pas de l'acétoine ; ne pousse pas à 45°c et en présence de 0.1% et 0.3% de bleue de méthylène .elle fermente ces sucres (fructose ; lactose ; galactose ; mannitol ; saccharose et glucose),et elle ne fermente pas (l'amidon ; glycérol ; xylulose ; maltose et Adonitol). Cette souche peut s'apparenter *Lactococcus lactis*, mêmes résultats ont été trouvés par (**Sharpe ;1979 ;Scheifer et al. ;1985 ;Bolows et al. ;(1991)**).

il n'y avait pas assez de recherche en ce qui concerne l'isolement les BAL à partir du lait de chamelle ; mais il existe d'autres travaux ayant portés sur lait de chèvre, les travaux de (**Badis et al. ; 2005**) ;(**Achamchem, 2014**) effectués sur le lait chèvre de deux populations caprines algériennes (Arabia et Kabyle) ont montré une prédominance du genre de *lactobacillus* 61.48% dans la population kabyle ; alors que les genres *leuconostoc* 32.64% et *lactococcus*31.02% dominant la population arabia.par ailleurs **Guessas et al . ;2004**) ;ont identifié les BAL du lait de chèvre des zones arides et ont constate une prédominance des coques par rapport aux bacilles ou *lactococcus sp* a présente le pourcentage plus élevé 76.16% ;suivi de *Streptococcus* 14.78 % ;*Leuconostoc* 8.6% ;faible concentration de *Lactobacillus* dans le lait de chamelle du à leur exigences nutritionnelle qui sont assemblables de notre travail. il n'y avait pas assez de recherche en ce qui concerne l'isolement les BAL à partir du lait de chamelle ; mais il existe d'autres travaux ayant portés sur lait de chévre.les travaux de (**Badis et al. ; 2005**) ;(**F. Achamchem . 2014**) Effectués sur le lait chèvre de deux populations caprines algériennes (Arabia et Kabyle) ont montré une prédominance du genre de *lactobacillus* 61.48% dans la population kabyle ; alors que les genres *leuconostoc* 32.64% et *lactococcus*31.02% dominant la population arabia.par ailleurs **Guessas et al . ;2004**) ;ont identifié les BAL du lait de chèvre des zones arides et ont constate une prédominance des coques par rapport aux bacilles ou *lactococcus sp* a présente le pourcentage plus élevé 76.16% ;suivi de *Streptococcus* 14.78 % ;*Leuconostoc* 8.6% ;faible concentration de *Lactobacillus* dans le lait de chamelle du à leur exigences nutritionnelle qui sont assemblables de nos travail.

Résultats et discussion

Des résultats similaires ont été rapportés par **Karam *et al.* ; 2006** dans la caractérisation de des isolats de bactéries lactiques à partir de lait cru de chamelle des régions de Timimoun et Béchar (Sud algérien). (**Saidi *et al.* ;2005**) ont montré une distribution hétérogène des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de dromadaire. La présence du genre *Leuconostoc* dans le lait cru de chamelle analysé était très faible. *Lactobacillus plantarum* était la seule espèce de lactobacilles trouvée dans les échantillons de lait de chamelle mémé resultats a été obtenues par (**Karam *et al.* ;2006**)

3) Caractérisation technologique des BAL isolées de lait de chamelle de la région d'Adrar :

3.1) pouvoir acidifiant :

Les tableaux suivantes représentent les Valeurs des cinétiques de croissance ; d'acidité et le pH en milieu lait écrémé en fonction du temps.

Le temps	0h	2h	4h	6h	12h	18h	24h	48h
Ph	6.30	5.80	5.30	05 .00	04.80	04.65	04.39	04.25
d°	20	25	40	60	80	110	130	150
Logufc/ml	8.98	9.15	9.25	10.22	10.66	10.33	9.88	9.75

Tableau15: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; l'acidité et le pH en milieu lait écrémé en fonction du temps de *leuconostoc*

Le temps	0h	2h	4h	6h	12h	18h	24h	48h
Ph	6.43	6.39	6.30	06.00	05.80	05.40	05.29	05.01
d°	18.5	20	22.1	25	32.5	45	80	100
LogUFC/ml	7.75	7.88	7.98	8.23	8.35	8.70	8.88	9.14

Tableau16: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; l'acidité et le pH en milieu lait écrémé en fonction du temps de *lactobacillus*

Le temps	0h	2h	4h	6h	12h	18h	24h	48h
Ph	6.31	5.8	5.5	5.10	05.00	04.80	04.50	03.99
d°	20	30	40	80	110	130	150	160
LogUFC/ml	8.99	9.25	9.55	10.64	10.79	10.22	9.75	9.43

Tableau17: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; d'acidité et le pH en milieu lait écrémé en fonction du temps de *lactococcus*

Résultats et discussion

Le temps	0h	2h	4h	6h	12h	18h	24h	48h
Ph	06.10	05.60	05.35	05.06	04.78	04.80	04.50	04.00
d°	25	28	45	58	72	80	100	155
Logufc/ml	8.66	8.80	9.45	10.89	10.88	10.43	9.35	9.88

Tableau18: représente les Valeurs des cinétiques de croissance ; l'acidité et le ph en milieu lait écrémé en fonction du temps de *streptococcus*

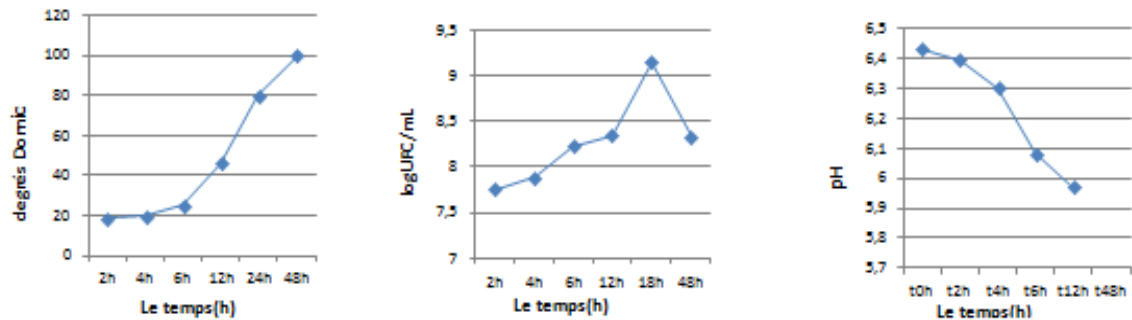


Figure 20: Courbe de cinétique de croissance (au centre), valeurs de l'acidité en °D (à droite) et les valeurs de pH (à gauche) de *lactobacillu*

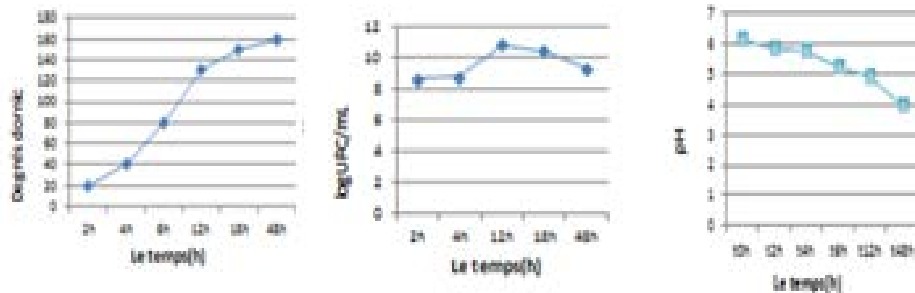


figure21 : Courbe de cinétique de croissance (au centre), valeurs de l'acidité en °D (à droite) et les valeurs de pH (à droit) de *streptococcus*.

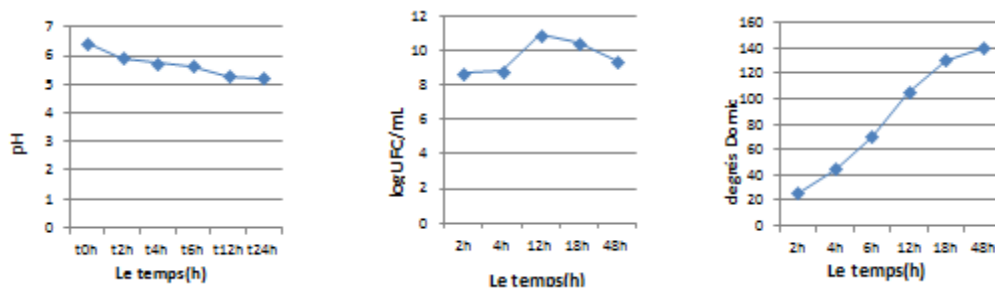


figure22: Courbe de cinétique de croissance (au centre), valeurs de l'acidité en °D (à droite) et les valeurs de pH (à gauche) de *lactococcus*.

Résultats et discussion

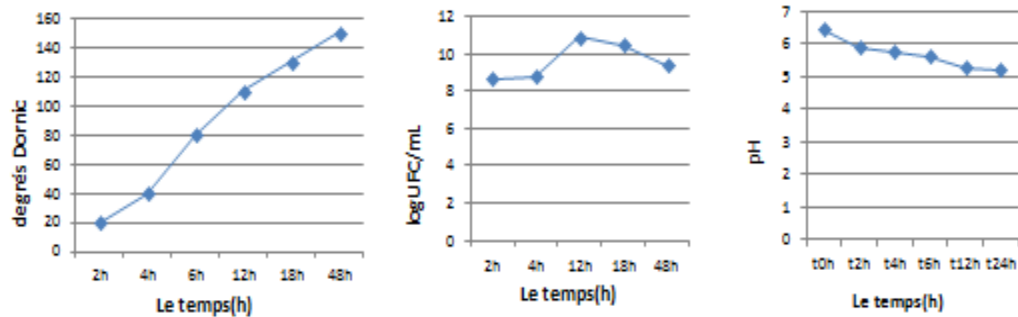


Figure 23: Courbe de cinétique de croissance (au centre), valeurs de l'acidité en °D (à gauche) et les valeurs de pH (à droite) de *leuconostoc*.

Les graphiques montrent l'évolution de la croissance et de l'acidité et diminution de pH en fonction du temps, on observe les phases de croissance bactérienne et on peut expliquer l'absence de la phase de latence par le fait que les souches étudiées ont une origine laitière donc elles n'ont pas besoin de s'acclimater au milieu utilisé pour l'étude.

3.3 L'activité protéolytique :

L'activité protéolytique des souches a été recherchée sur gélose MRS additionnée 10% lait écrémé après incubation à 30°C ; l'activité est manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Trois souches sont capables de hydrolyse de caséine (*lb.plantarum* ; *ln.mésentéroïdes* ; *lactococcus lactis*) (présence d'halo clair autour des souches) et une souche (*streptococcus thermophilus*) est incapable d'hydrolyse de caséine l'absence d'halo clair. Les résultats ont été démontrés dans la figure 24.

3.4 L'activité lipolytique :

Cette activité a été recherchée sur gélose MRS additionnée 1% tween 80 cette activité s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies trois souches donnent des résultats + ; et une souche donne résultat.

Nous avons remarqué la présence des halos clairs autour des souches (*Lactobacillus* ; *Leuconostoc* ; *Lactococcus*) : réaction positive pour les deux activités lipolytiques et protéolytiques et l'absence des zones claires autour de la souche de *Streptococcus thermophilus* : réaction négative. Les résultats ont été démontrés dans la figure 24.

Résultats et discussion

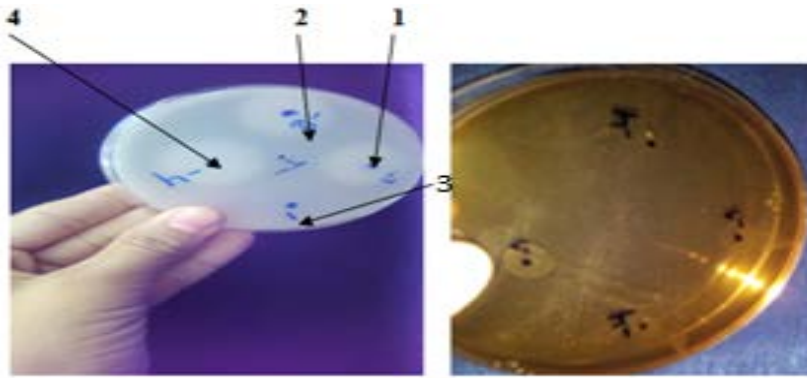


Fig24: résultat de l'activité protéolytique (à gauche) ; l'activité lipolytique (à droit) (*ILb* ; *2Ln* ; *3Str* ; *4Lc*)

3.2) Résultats des interactions bactériennes

6.1 Recherche des interactions entre les différentes souches lactiques et de les pathogènes :

6.1.1) Interaction entre les bactéries lactiques :

Les résultats des tests d'interactions des souches Lactiques entre-eux sont présentés dans le figure25.

L'étude des interactions entre les bactéries lactiques (*Ln. mesenteroides* et *Lb.plantarum*) présentent une interaction positive et les autres isolats présentent une interaction négative qui correspond à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique .les résultats ont été exprimés par la mesure les diamètres des zones d'inhibitions.

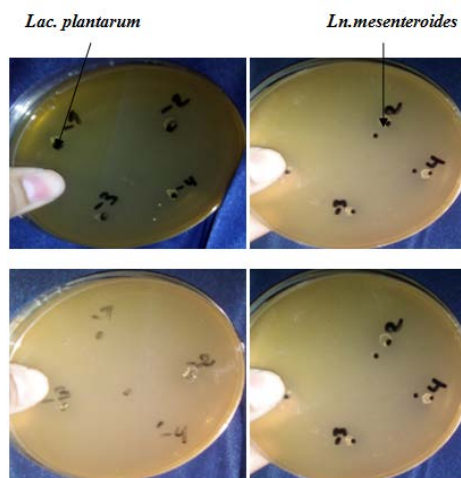


Figure25 : les interactions entre les souches lactiques

Résultats et discussion

6.1.2.) les interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes :

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (**Fleming et al., 1975**). Les résultats obtenus montre la présence de zones d'inhibition autour des spots traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la totalité des souches cibles utilisées. Le tableau (19) représente des diamètres d'inhibitions exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche. Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques, d'origine laitière ou autre, contre des bactéries pathogènes et altérantes a été mentionnée par plusieurs auteurs (**De Martinis et al., 2001 ; Anas et al., 2008 ; Yateem et al., 2008 ; Moraes et al., 2010 ; Abrams et al., 2011 ; Castro et al., 2011**).

Selon Yateem *et al.* (2008) qui ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait dont l'effet antagoniste s'était exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella ssp* et *E. coli*), mais aucun effet n'a été détecté sur *Staphylococcus aureus*. Au contraire, **Ammor et al. (2006)** qui ont isolé des souches lactiques dont l'effet antagoniste était restreint aux bactéries à Gram positif, celles à Gram négatif étant résistantes.

Il est à noter que parmi les 04 souches lactiques isolées dans ce travail, celles provenant du lait de chamelle étaient plus performantes avec un spectre d'activité large sur les bactéries indésirables testées dans ce travail. Ceci peut expliquer la longue durée de conservation du lait de chamelle et son intérêt thérapeutique (**Hassan et al., 2008**). Plusieurs travaux ont démontré la capacité des bactéries lactiques à inhiber des souches de *Listeria monocytogenes* (**Benkerroum et al., 2000 ; Pinto et al., 2009 ; Hartmann et al., 2011 ; Xie et al., 2011**) et de *Listeria innocua* (**Simova et al., 2009 ; Pringsulaka et al., 2011**) et les autres pathogènes *E.coli ;s.aureus ;Candida albicans* (**Achemchem, 2014 ; Abassa, 2012 ; Hassaine, 2013**).

Résultats et discussion

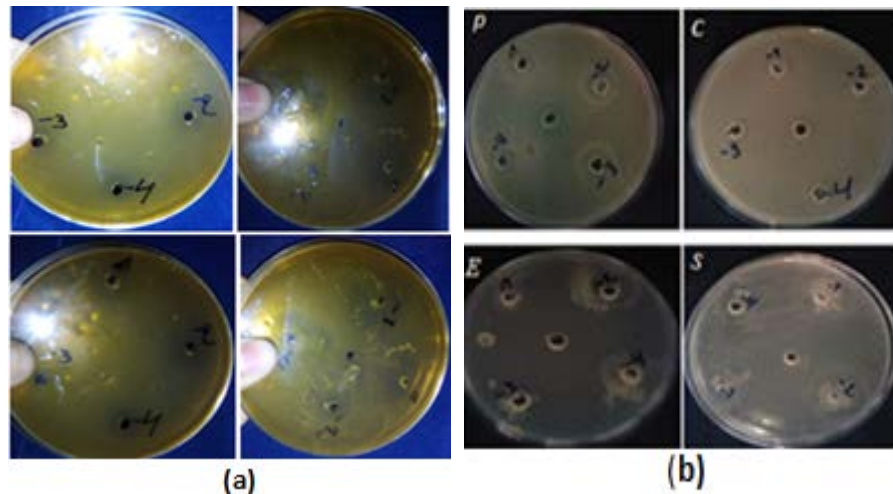


Figure 26 : Spectre d'action des souches des *lactiques lactobacillus plantarum* ; (BL1) *leuconostoc mesentéroïdes* ; (BL2) *streptococcus* ; (BL3) *lactococcus lactis* (BL4) vis-à-vis les souches pathogènes (P): *pseudomonas aeruginosa* ; (C) : *condida albicans* ATCC10231; (E): *Escherichia coli* ATCC 25921 (S): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (a) : **méthode directe** ; (b) : **méthode indirecte**

Tableau 19 : spectre d'action les BAL entre eux et les germes pathogènes

Souches indicatrice	milieu	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)			
		<i>Lb.plaratum</i>	<i>Ln.mesenteroides</i>	<i>Stre.thermophilus</i>	<i>Lc.lactis</i>
<i>Pseudomonas.aeruginosa</i>	KINGA	22	29	20	23
<i>Staphylococcus.aureus</i>	CHAPMAN	10	11	9	9
<i>Condida .albicans</i>	PCA	6	4	4	5
<i>Eschrichia.coli</i>	VRBG	40	14	18	12
<i>Alternaria.alternata</i>	Sabouraud	-	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Sabouraud	5	4	10	6
<i>Lactobacille plantarum</i>	MRS	-	-	-	-
<i>Leuconostoc.mesenteroides</i>	MRS	5	-	-	-
<i>Streptococcus.thermophilus</i>	MRS	-	-	-	-
<i>Lctococcus.lactis</i>	M17	-	-	-	-

(-) : pas des zones d'inhibitions

Résultats et discussion

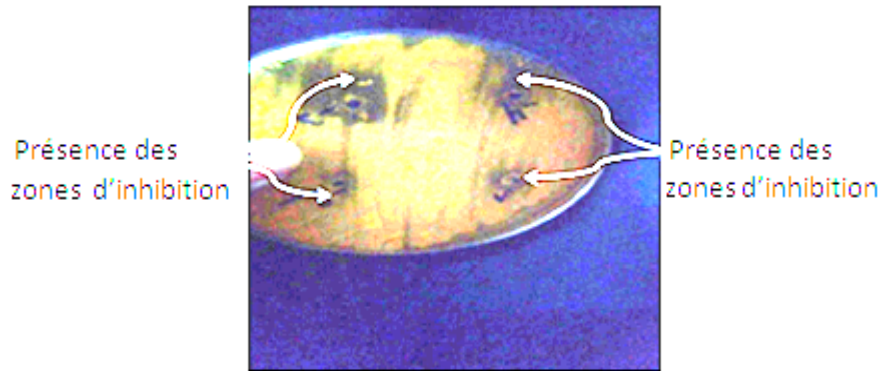


Figure 27: résultat d'interaction des souches lactiques (*lactobacillus plantanum*; *leuconostoc méseenteroides* ;*streptococcus thermophilus* ;*lactococcus lactis*) avec *Aspergillus brasiliensis*, (présence des zones claires sont des zones d'inhibition).

D'après ces résultats ; la majorité des souches présentent une activité inhibitrice ; vis à vis les souches pathogènes.ces résultats indiquent que nos bactéries sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. l'ensemble des souches ne présentent pas même spectre d'action contre les souches pathogènes (**Onda et al. ; 2003**).tous les souches lactiques *lactobacillus plantarum* ; *leuconostoc méseenteroides* ;*lc.lactis* ;*str.thermophilus*) présentent une large spectre élargie vis-à-vis *pseudomonas aeroginosa* qui induite par l'effet de l'acide lactique et bactériocines les resultats ont été obtenues dans figure26. Même résultat a été trouvé par (**rahli, 2015 ; F.Achemchem ;2014**) En comparaison avec les autres souches, tous les souches montrent un grand pouvoir inhibiteur envers Les souches pathogènes. Contrairement à certaine souches qui sont plus actives sur les Gram positifs, les souches possèdent un pouvoir inhibiteur à spectre large et il est d'autant plus grand sur *Pseudomonas aeroginosa* .la souche *lactococcus lactis* et *streptococcus thermophilus* ont grand pouvoir inhibiteur vis à vis *Aspergillus brensiliensisles* .les résultats ont été obtenues dans le figure27.

3.5) Résistance à des enzymes gastrique

La pepsine est une enzyme du sac gastrique ; d'après les résultats obtenus qui sont illustrés dans la figure 21 aucune souche n'a survie au pH2 additionné de 3mg/ml de pepsine .cependant une résistance remarquable des souches (*Str.thermophilus* et *Lc.lactis*) à pH3 additionné de la même quantité de pepsine pendant 3h. le graphe05 a été démontré les résultats. Même résultat a été trouvé par (**Rahli. 2015**)

Résultats et discussion

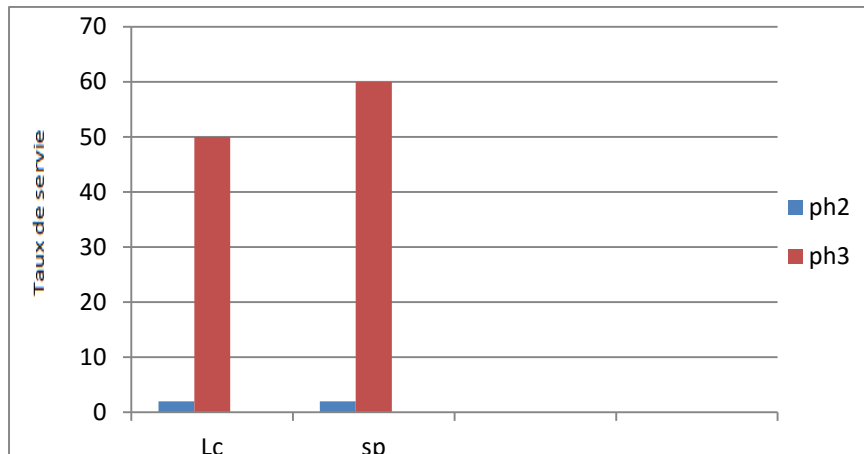


figure28 : la résistance des souches lactiques à la pepsine aux différents pH

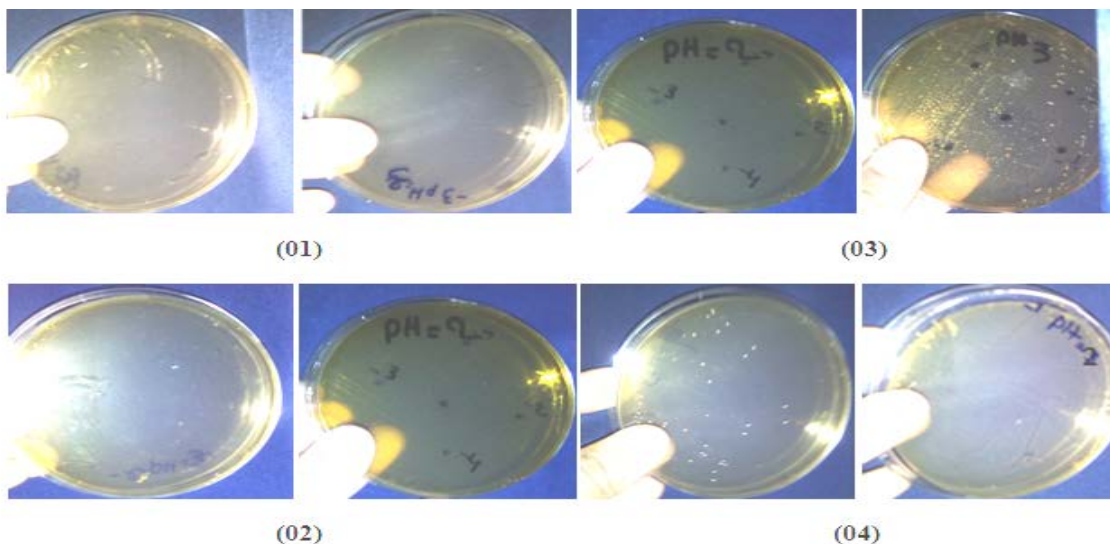


Figure29 : résultats de croissance sur milieu MRS au pepsine à différents pH ;(01) *Lactobacillus* à (pH2 et pH3+ pepsine) ne pousse pas ; (02) : *Leuconostoc* à (pH2 et pH3) + pepsine ne pousse pas ;(03) *Streptococcus* pousse à pH3 et ne pousse pas à pH2 ;(04) *Lactococcus* pousse à pH3+pepsine et ne pousse pas à pH2+pepsine à 30°C

3.6) Résistance à l'acidité :

Les deux souches ont donné une bonne croissance sur le milieu pH7 qui atteint les 100% (taux de survie) et en l'autre part la croissance a été moyenne à pH3 (50% taux de survie) et faible à pH2 (05% taux de survie). Les résultats obtenus pour cette étude sont montrés dans le graphique 06. Nous avons remarqué que la résistance aux acides est diminuée avec la diminution de pH. Mêmes résultats ont été trouvés par (Rahli. ;2015 ; O'sullivan et Condon ; 1997) ont montré une bonne résistance de la souche *Streptococcus thermophilus* au pH acide dont la survie était de 100% à pH 4 après 2h, il a rapporté que la majorité des BAL possèdent un mécanisme de

Résultats et discussion

tolérance en milieu acide ;ils sont capables de survivre à des concentrations en acide. D'autre part ; les travaux de **Mathara et al. ; 2008**) Ont montré une tolérance des souches de *Lactobacillus sp* vis-à-vis aux pH2.5 et pH2 après 2h d'incubation

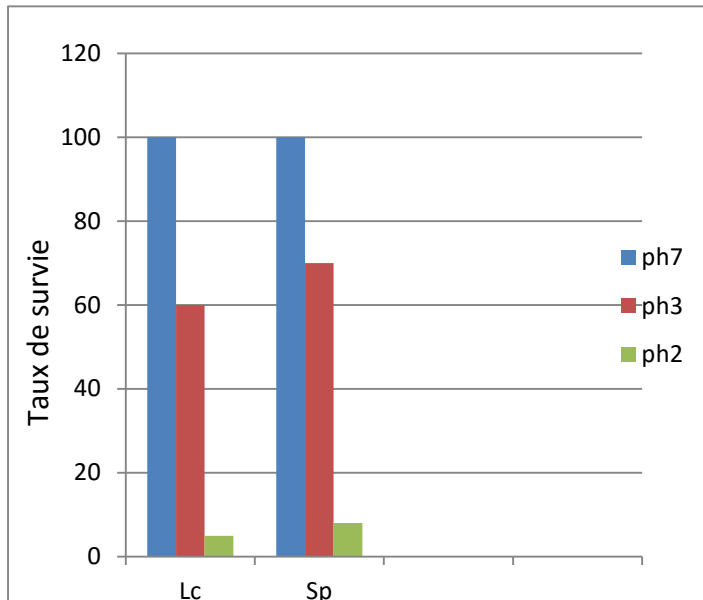


figure29: la résistance des souches aux milieux acides. **Lc** : *lactococcus lactis subsp lactis* ; **sp** :*Streptococcus thermophilus*

3.7) Résistance à des ATB(Antibiogramme) :

Le BAL ont été testés en milieu MRS solide vis –à-vis de 10 ATB en disques .la lecture de ces antibiogrammes consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Nous avons considérées un diamètre inférieur ou égal 15mm .les bactéries cultivés en milieu MRS sont considérées comme résistantes à atb.et qu'au-delà de 15mm les souches lui sont sensibles (**karam et al ; 1994**).les résultats d'antibiogramme ont été montrées dans le figure 30

Résultats et discussion

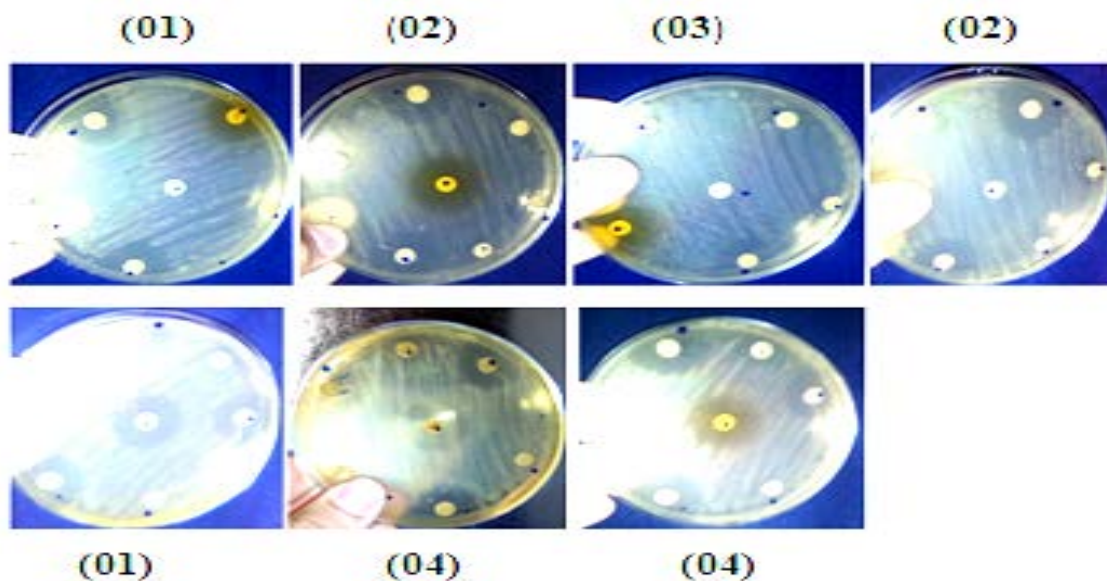


Figure30: résultats d'antibiogramme pour les souches lactiques; (01)*Streptococcus* ;(02)*Lactococcus* (03)*Lactobacillus* ;(4)*Leuconostoc* après 24h d'incubation .

Les résultats obtenues pour l'ensemble des souches sont présentés dans le **tableau 20**.ils montrent que la sensibilité au ATB est différent à la fonction des souches .la bactérie résistant à la plus nombre d'ATB c'est la souche *Streptococcus thermophilus* ;*lactococcus lactis* (résistant à 7ATB sur les 10 testés) ; viennent ensuite les bactéries (*Lactobacillus plantarum* ; *Leuconostoc méésentéroïdes subsp méesenteroides*) qui résistent à 06 ATB . Tous les souches sont sensibles aux 3 antibiotiques ; Péfloxacine ; Nitroxoline et Netilmicine et sont toutes résistantes à la Pénicilline ; Kanamycine ; Ceftazidime ; Cefotétan ; Acide nalidixique ; Sulfamide

Antibiotiques Souches	SSS	P	K	B	CT	PEF	NA	CZ	NET	NTX
<i>Lb.plantarum</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>Ln.mésenteroides</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>Str.thermophilus</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
<i>Lc. lactis</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S

Tableau 20 : résultats d'antibiogramme pour les bactéries lactiques.

(R): résistantes ; (S) : sensibles.

Résultats et discussion

SSS :sulfamide ;P :pénicilline ;K :kanamycine ;CZ :ceftazidime ;CT :cefotétan ;PEF :péfloxac
ine ;NA : acide nalidixique ; NTX :nitroxoline ; B : Bicitacine :NET :Netilmicine

Les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d'analyse (**Guessas, 2007**). Le lait de chamelle (*Camelus dromedarius*) est depuis longtemps considéré comme un aliment thérapeutique par les habitants des régions arides. Il est très bien protégé contre différents contaminants microbiens par des systèmes inhibiteurs naturels, incluant le système LPS (lactoperoxydase/ thiocyanate/ peroxyde d'hydrogène), les lactoferrines, les lysozymes, les immunoglobulines et les acides gras libres (**Benkerroum et al., 2004**).

Le lait de chamelle contient aussi une microflore variée qui constitue une deuxième ligne de défense par la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines (**Konuspayeva et al., 2003**).

Dans ce travail nous avons étudié le potentiel probiotique et technologique de quelques genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* ;*Lactococcus* ;*Leuconostoc* isolées du lait cru de chamelle Algérien

Les tests de ré-identification des souches lactiques nous ont permis de confirmer que ces souches appartiennent à l'espèce de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ;*lactococcus lactis subsp lactis* *Streptococcus thermophilus* ;*Lactobacille plantarum* .

Les résultats d'identification de cette étude montrent la présence majoritaire des coques par rapport les bâtonnets est ont été retrouvés à faibles pourcentage les mêmes résultats est apporté par **Franciosi et al. ; 2009 ; Cheriguene ;2008 ;Kacem et al . ; 2002**). Les lactocoques ont la capacité inattendue de résister à une concentration de 6,5% de NaCl. Cette concentration saline est plus élevée que celle de 4,5% de sel communément rapportée dans la littérature. Ce phénomène a été également rapporté par **Karam et al .;2006** qui ont confirmé la présence dans le lait de chamelle, de lactocoques résistants à des concentrations élevées de sel. Mêmes résultats a été mentionné par **Belarbi ;2011** qui a isolé un nombre élevé de souches de *Lactococcus atypiques* qui poussent en présence de 6,5% NaCl dans le lait cru de chèvre .

La présence du genre *Leuconostoc* dans le lait cru de chamelle analysé était très faible Cette dernière espèce est souvent détectée dans de nombreuses variétés de fromages et produit laitiers fermentés. Bien qu'elle ait une faible activité acidifiante, elle contribue à la formation de l'arome des produits laitiers en produisant du diacétyle, de l'acétate et de

l'éthanol. En général, les espèces de *Leuconostoc sp.* sont connues pour leur rôle dans la fermentation et l'amélioration de la saveur des aliments par la production des composés aromatiques et également de la texture de ces aliments par la production de dextrane (**Hemme et al ; 2004**).

Les espèces de *Lactobacillus* identifiées est le genre *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus plantarum* était la seule espèce de *Lactobacilles* trouvée dans les échantillons de lait de chamelle les résultats assemblables ou travaux de **Karam et al . ;2006**.

L'aptitude de ces souches à inhiber un large groupe de bactéries pathogènes est confirmée par les résultats d'interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes utilisées dans cette étude et qui sont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas auroginosa ;et candida albicans* .l'ensemble des souches ne présentent pas même spectre d'action contre les souches pathogènes (**Onda et al. ; 2003**). *Lactobacille plantarum* et *Leuconostoc méserteroides subp méserteroides* .présentent un large spectre élargie vis-à-vis *Staphylococcus aureus* qui induite par l'effet de l'acide lactique et bactériocines. Même résultat a été trouvé par (**Rahli ;2015 ; Achemchem ;2014**)

Conclusion:

Les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats identifiés ont permis de les rattacher à quatre genres lactiques dont le plus dominant est le genre *Lactococcus* (53,6%) , *Streptococcus* (34%) ;*Lactobacillus* (13,4%) et *Leuconostoc* (4,4%). Les espèces dominantes sont : *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* .*Lactobacillus Plantarum* ;*Leuconostoc méésentéroïdes* ;*Streptococcus thermophilus* .Au vue des résultats générés, les espèces bactériennes isolées du lait de dromadaire ont des caractéristiques technologiques intéressantes faisant de ce lait un très bon substrat pour d'éventuelles applications technologiques. *Lactococcus lactis subsp lactis* et *Streptococcus thermophilus* sont des espèces dominantes parmi l'ensemble des bactéries lactiques isolées. Cette espèce est très recherchée dans l'industrie laitière pour ses aptitudes acidifiantes et aromatisantes et pourrait éventuellement être utilisée comme un levain pour la fermentation de lait de chamelle.

Les références bibliographiques et les annexes

Les références bibliographiques

- 1) A. Philippon et C. Poyart. Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical : *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique. 90-05-0120. (2008) 1-11.
- 2) Achemchem. F et ABRINI. J (2005) : Production de Bactériocines par des bactéries lactiques isolées à partir du jben de chèvre du nord du Maroc. Tétouan, Maroc. Pp : 170-182.
- 3) Axelsson. L. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
- 4) Axelsson. L. (2004) chapter lactic acid bacteria microbiological and functional aspects edition Marcel, Dekker third edition.
- 5) Anonyme., 1964 - Aperçu sur quelques légumineuses Calédoniennes. Rev. agric. Nouvelle- Calédonie, 1964 : 10 – 15 p.
- 6) Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaâ, B., Henni, D. E. et Kihal, M., 2004: Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21, 579–588.
- 7) Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R., 2006: Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux population caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Tech.* 23, 30-37.
- 8) Benhamouche. N 2005: Sélection de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (L.M.A). Thèse pour l'obtention du diplôme de magistère en microbiologie appliquée. Université d'Oran. 1-90.
- 9) Benguella Nassima ; 2015 :Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle Pour l'Obtention du Diplôme Master en Agronomie
- 10) BOUDY P., 1952. Guide du forestier en Afrique du Nord. Ed. Librairie agricole, Paris, 482 p.
- 11) BEN AÏSSA R., (1989)., Le dromadaire en Algérie. CIHEAM-IAMZ, Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens n° 2., 19-28p.

Les références bibliographiques

- 12) Carr, F. J., Chill, D. et Maida, N., 2002: The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol*, 28: 281-370.
- 13) De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E., 1960, A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135
- 14) De Roissart, H. B. et Luquet, F. M., 1994: Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. Vol. bactéries lactiques (tome 1). Ed. Loriga (Chemin de saint -gorges). 25-23
- 15) De Souza Oliveira, R. P., Perego, P., Converti, A., De Oliveira, M. N., 2009: Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Eng.* 91, 133–139.
- 16) De Man, J. C., Rogosa, M. et Sharpe, M. E., 1960: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135
- 17) de Vos, W. M., 1996: Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70-223.
- 18) DUBOST D., 2002 - Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Ed. CRSTRA, Biskra, 423p.
- 19) DUTIL P., 1971 - Contribution à l'étude des sols et des paléosols du Sahara. Thèse Doctorat ès sc. natu., Univ. Strasbourg, 300p.
- 20) De Vuyst, L. et Vandamme, E. J., 1994: Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics, and Applications.* 1-11.
- 21) Fleming, H. P., Erchells, J. L. et Caslilow, R. N., 1975: Microbial inhibition of isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Appl. Environ. Microbiol*, 30, 1040-1042
- 22) GUIRAUD J.P (1998) : Microbiologie alimentaire, DUNOD, Paris. P : 80, 84, 116, 282,283, 291
- 23) J. B. Milliere, A. G. Mathot, P. Schmitt et C. Divies. Phenotypic Characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of applied bacteriology* ,67 (1989) 529-542.
- 24) J.M. Swenson, R.R Facklam. et C. Thornsberry. Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Apr. (1990) 543-549.
- 25) Hamedi Amine Rizk ; 2009 : Etude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle pour l'obtention du Diplôme Master en Microbiologie Appliquée

Les références bibliographiques

- 26) Maha Alaoui Ismaili , Jamila Guilal , Abed Hamama , Bouchta Saidi , Mohamed Zahar ;2016 : Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc.the international journal of multi-disciplinary sciences-81-94..
- 27) Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl): 365S–73S
- 28) Omar hassaine;2013:caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (L.M.A). Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran. 1-90.
- 29) TABAK Souhila, BENSOLTANE Ahmed ;2011 : L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales in *Nature & Technologie*.
- 30) Saïdi, n., (1998) bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse magister université d'Oran.
- 31) Stiles, M. and Holzapfel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp: 1-29.
- 32) MOULAY M., 2014 - Caractérisation écologique de peuplement de *Balanites aegyptica* (L) Del à oued Matriouane dans la région d'Aoulef Adrar. Thèse Master. Univ Tlemcen. p 12
- 33) Ramet J.P.(2003).aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. actes de l'atelier international sur : lait de chamelle pour l'afrique »,5-8novembre ;niamey ;niger.
- 34) Saidi N. ;Guessas B.,Bensalah F. ;Badis;Hadadji;M.;Henna de;previst;h.kihal;m.:(2002).caractérisation des bactéries lactiques isolés du lait cru de chèvre des régions arides d'algerie.journal algérien des régions arides .01 :01-14
- 35) Sboui A ;Khorchanit. ;Djeghan M et Elbelhadjo.(2009).comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du sud tunisien ;variation du ph et l'acidité à la différentes temperature.afrique science 05(02)(2009)293-304.
- 36) Marshall, V. M. et Cole, W. M., 1983: Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*

Les références bibliographiques

and their contribution to flavor production in fermented foods. *J. Dairy. Res.* 50-375.

- 37) Wilson, A. R., Sigeo, D. et Epton, H. A. S., 2004: Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1516-1522.