

Liste des abréviations

Noms de genres bactériens

B. : *Bacillus*

BF. : *Bifidobacterium*

E. : *Escherichia*

En. : *Enterococcus*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

P. : *Pediococcus*

S. : *Staphylococcus*

St. : *Streptococcus*

Unités de mesures

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

cm, mm, nm : Centimètre, millimètre, nanomètre

g, mg : Gramme, milligramme

h, min, s : heure, minute, seconde

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

M, mM : Molaire, milli molaire

N : Normalité

U : Unité

UI : Unité Internationale

Autres abréviations:

ADH : Arginine Dihydrolase

Amd : amidon

ARA : arabinose

Cel : cellobiose

EPS : Exopolysaccharides

ESC : esculine

FAO : Food and Agriculture Organization

GAL : galactose

GLYG : glycogène Lac : lactose

Mal : maltose

Man : mannitol

Mél : mélibiose

pH : Potentiel d'Hydrogène

qsp : Quantité suffisante pour

R: rifampicine

Raf : raffinose

Rib : ribose

RAF : raffinose

Sac : saccharose

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

SOR : sorbitol

T: triméthoprim
UFC : Unité Formant
Colonie

Liste des figures

Figure 1. Répartition géographique des principales races de dromadaires en Afrique du Nord.	6
Figure 2. Dégradation du glucose par les bactéries lactiques.....	12
Figure 3. <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> selon la souche	15
Figure 4. Métabolisme du pyruvate chez <i>L. lactis</i>	17
Figure 5 : Clé d'identification des bactéries à gram positif	44
Figure 6: Schéma représentant la mini préparation pour le test de la fermentation des sucres	46
Figure 7: Schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées.....	47
Figure 8 : Instruments pour la mesure de l'acidité titrable.	49
Figure 9: protocole du dosage de la somme du diacétyle-acétoïne	51
Figure 10 : colonies développées issues du lait de chamelle ensemencé sur milieu PCA.	53
Figure 11 : Lecture des résultats des coliformes totaux (A) et les coliformes fécaux (B).....	55
Figure 12 : La lecture des résultats des streptocoques fécaux sur le milieu Rothe.	56
Figure 13 : Résultat négatif de staphylocoques sur le milieu Chapman.	56
Figure 14 : Absence des clostridiums sulfite-réducteurs sur le milieu VF.	57
Figure 15 : Dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS.	57
Figure 16. Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactique sur Elliker +Rifampicine (0,1mg/ml) « photo A » et sur Elliker +Triithoprème (0,5mg/ml) « photo B ».	63
Figure 17. Purification des souches de <i>Lactococcus</i> sp sur milieu Elliker.....	63
Figure 18. Aspect microscopique de <i>Lactococcus</i> sp.....	64
Figure 19. La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).....	66
Figure 20. Résultat de type fermentaire des isolats.	66
Figure 21. Résultat du test de lait de Sherman	67
Figure 22. Test de réduction de citrate sur milieu KMK.	68
Figure 23. Test de réduction de citrate sur milieu citrate de Simmons.....	68
Figure 24. Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (4% NaCl).....	69
Figure 25. Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.	69
Figure 26. Résultat de La croissance des isolats sur milieu Elliker pH 4.....	70
Figure 27. Résultat du test de croissance à 10°C	70
Figure 28. Résultat de la dégradation de l'esculine sur BEA.	71
Figure 29. Test de la production d'acétoïne.	71
Figure 30. Résultats du test de sucre des isolats.....	72
Figure 31. La galerie biochimique de la souche.	72
Figure 32. Les cinétiques d'acidifications, l'évolution de l'acidité titrable (A) , l'évolution de pH (B), des souches ((MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) dans lait écrémé.	78
Figure 33. L'évolution de la biomasse sur milieu Elliker lactosé des souches dans lait écrémé.....	80
Figure 34. Evolution de la production du diacétyl par la souche MR32.	80
Figure 35. Cinétiques d'acidification des trois souches en culture mixte dans le lait écrémé, évolution du pH (A), évolution de l'acidité titrable (B)	81
Figure 36. Histogramme de la production du diacétyl par la souche MR32 en culture mixte.	82
Figure 37. Evolution de la production du diacétyle par la souche MR32 en culture mixte.....	82

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques lactocoques	18
Tableau 2. Caractéristiques physiologique et biochimique du genre <i>Lactococcus</i>	18
Tableau 3. Profil fermentaire du genre <i>Lactococcus</i>	19
Tableau 4. Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement.....	21
Tableau 5. Les lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers.....	21
Tableau 6. Milieux de culture pour la croissance de micro-organismes importants en laiterie.....	27
Tableau 7. Résultats de la croissance des 18 souches sur huit milieux de culture.....	27
Tableau 8. Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et leur mécanisme d'action.....	28
Tableau 9. Echantillons de laits de chèvres collectés.....	30
Tableau 10. Estimation de la charge bactérienne par l'épreuve au bleu de méthylène.....	32
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats du test de la réductase.....	52
Tableau 12. Dénombrement de la FTAM dans les échantillons de lait cru de chèvre analysés.....	53
Tableau 13 : Dénombrement des entérobactéries dans les sept échantillons.....	53
Tableau 14. Résultats de dénombrement des coliformes pour les sept échantillons collectés.....	54
Tableau 15 : Résultats de dénombrement de la flore lactique chez les différents échantillons du lait..	58
Tableau 16. Sans addition des antibiotiques.....	60
Tableau 17. Avec l'addition du Triméthoprim.....	60
Tableau 18. L'addition de la rifampicine à différentes concentrations.....	60
Tableau 19. L'addition de Triméthoprim et la rifampicine.....	61
Tableau 20. Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre présumées <i>Lactococcus</i> isolées du lait cru de chèvre.....	73
Tableau 21. Profile fermentaires des isolats du genre présumé <i>Lactococcus</i> sp.....	74
Tableau 22. Profil fermentaire et biochimique des isolats par galerie API 20 Strep.....	75

Résumé :

Le lait de chamelle présente un intérêt particulier pour toutes les populations, car il est parfaitement conforme aux exigences de l'homme vu sa haute teneur en nutriments de base. Le lait de chamelle peut être consommé cru, pasteurisé ou fermenté. Il peut être un vecteur de transmission de germes pathogènes à l'homme et peut présenter un risque pour la santé humaine. L'évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique du lait cru destiné à la consommation ou à la transformation est donc essentielle pour la protection du consommateur. La présente étude porte sur l'évaluation de la qualité microbiologique de sept échantillons du lait cru de chamelle, suivant les méthodes recommandées par la réglementation algérienne. Nos résultats montrent une charge en flore aérobie mésophile totale (FAMT) inférieure à 10^5 UFC/ml chez tous les sept échantillons. Nous avons enregistré un nombre entre 10^2 et 10^3 germes par 1 ml de lait cru de chamelle. Les échantillons du lait analysés présentent une charge en coliformes avec une valeur minimale de 0.3×10^2 UFC/ml et maximale de 2.5×10^2 UFC/ml par contre aucun résultat positif pour les coliformes fécaux. Absence des germes de streptocoques fécaux sauf le 2^{ème} échantillon qui avait un taux supérieur à la norme. Cette analyse mentionne que tous les échantillons sont dépourvus des germes pathogènes.

Notre thème est consacré aussi à la recherche d'un milieu de culture spécifique pour le développement des espèces de *Lactococcus*. Différents milieux de culture, M17 Rifampicine, Elliker Rifampicine, M17- triméthoprim et Elliker –triméthoprim ont été testés sur 40 souches de *Lactococcus* isolées du lait cru de chamelle de différentes régions de l'Algérie. Après plusieurs essais, et études comparatives, le milieu Elliker triméthoprim a été retenu pour suivre l'isolement spécifique des espèces de *Lactococcus*. Les tests d'identification phénotypique, morphologiques, physiologiques, et biochimiques ont confirmé l'appartenance des 80 isolats aux espèces du genre *Lactococcus*. Ce milieu a permis l'isolement sélectif des espèces de *Lactococcus* suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus raffinolactis*.

Les cinétiques de croissance, de pH, d'acidité Dornic, et de production d'acétoïne-diacétyl des souches MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28 dans le lait écrémé ont montré que nos souches produisent un taux élevé d'acide lactique au bout de 24 heures, avec une production de diacétyl très importante.

Mots-clés : Milieu de culture, acétoïne-diacétyl, croissance, lait de chamelle, cinétique de croissance, *Lactococcus*, qualité sanitaire.

Abstract :

Camel milk is of particular interest to people, as it is perfectly consistent with human requirements given its high content of basic nutrients. Camel milk can be consumed raw, pasteurized or fermented. It can be a vector for the transmission of pathogens to humans and may pose a risk to human health. The evaluation of the sanitary quality of raw milk destined to the human consumption is essential for the protection of the consumer. This study focuses on the evaluation of the microbiological quality of seven samples of camel milk, according to the methods recommended by the Algerian regulations. Our results showed a load total mesophilic aerobic flora (FAMT), less than 10^5 CFU / ml in all seven samples. We recorded a number between 10^2 and 10^3 cells per 1 ml of camel raw milk. The analyzed samples of milk have a coliform load with a minimum value of 0.3×10^2 CFU / ml and a maximum of 2.5×10^2 CFU / ml, however, any positive results for fecal coliforms are registered. Absence of faecal streptococci except the second sample which has a higher rate than the norme. this analysis indicated that all samples were free of pathogens.

Our theme is devoted to research of a specific culture medium for the development of *Lactococcus* species. Different culture media, M17 Rifampicin, Rifampin Elliker, M17-trimithoprim and Elliker -triméthoprim were tested on 40 *Lactococcus* strains isolated from camel raw milk. After several trials and comparative studies, Elliker-trimithoprim medium was chosen to follow the specific isolation of *Lactococcus* species. Phenotypic, morphological, physiological, and biochemical identification confirmed that the 80 isolates belong to the *Lactococcus* genus. This medium allowed the selective isolation of the following *Lactococcus* species including *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus plantarum* and *Lactococcus raffinolactis*.

The kinetics of growth, pH, Dornic acidity and diacetyl-acetoin production, of the MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63 and MT28 strains in the skimmed milk were conducted. The results obtained show that our strains produce high levels of lactic acid after 24 hours, with a very significant diacetyl production.

Keywords : culture medium, acetoin, diacetyl, growth, camel milk, growth kinetics, *Lactococcus*, sanitary quality.

ملخص

حليب الإبل يكتسي أهمية خاصة للإنسان، لأنه يتماشى تماما مع متطلباته نظرا لمحتواه العالي من المواد الغذائية الأساسية. ويمكنه أن يستهلك طازجا، مبسترا أو مخمرا. يمكن أيضا أن يكون ناقلا لمسببات الأمراض إلى البشر ويشكل خطرا على صحتهم.

تقييم الجودة الصحية للحليب الطازج أمر ضروري لحماية المستهلك. وتركز هذه الدراسة على تقييم الجودة الميكروبيولوجية لسبع عينات من حليب الإبل الطازج، وفقا للمعايير الجزائرية .

تشير النتائج التي توصلنا إليها إلى شحنة إجمالية من (FAMT)، وهي أقل من 10^5 ufc/ml في جميع العينات السبع المدروسة. سجلنا رقما بين 10^2 و 10^3 خلية لكل 1 مل من الحليب. العينات التي تم تحليلها من الحليب لديها حمولة بكتريا القولون مع الحد الأدنى من قيمة 0.3×10^2 ufc/ml وبحد أقصى 2.5×10^2 ufc/ml في حين لم نسجل أي نتائج إيجابية للبكتيريا القولون البرازية (les coliformes fécaux). وأشار غياب نوى العقديات البرازية (streptococques fécaux) عدا العينة الثانية. من وراء هذا الاختبار نستنتج إن جميع العينات كانت خالية من مسببات الأمراض وفقا للمعايير الجزائرية.

الاختبارات المورفولوجية والفيسيولوجية والبيوكيميائية لاربعة بكتيريا التي تم عزلها تؤكد أنها من نوع *Lactococcus*

بعد العديد من التجارب والدراسات المقارنة، يخصص موضوعنا أيضا لبحث على وسط زراعي يسمح بنمو أنواع *Lactococcus* حيث توصلنا إلى وسط ملائم لعزل و تطور هذه الأنواع (Elliker trimithoprime)

هذا الوسط يسمح لنا بعزل الأنواع التالية

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

تمت كذلك تطور حركة النمو، ودرجة الحموضة، وإنتاج ثنائي الأسيتيل-أسيتون في الحليب الخالي من الدسم. ، حيث أظهرت النتائج أن لدينا سلالات تنتج مستويات عالية من حمض اللبن بعد 24 ساعة، مع إنتاج معتبر جدا لثنائي الأسيتيل.

الكلمات المفتاحية: وسط زراعي، أسيتون، ثنائي الأسيتيل، النمو، حليب الإبل، حركة النمو، والجودة الصحية .

Table des matières :

INTRODUCTION :	1
CHAPITRE I : Revue bibliographique	
1. LE DROMADAIRE :	3
1.1. Alimentation du dromadaire :	4
1.2. Importance du dromadaire :	4
1.3 Répartition géographique :	5
1.4 Les races algériennes :	6
1.5. Production laitière :	6
2. LE LAIT DE CHAMELLE :	7
2.1. Composition et propriété physicochimique du lait :	7
2.2 Propriété médicinale :	8
1.2.3 Propriété technologique et produits fermentés	9
3. BACTERIES LACTIQUES :	10
3.1 Découverte des bactéries lactiques :	10
3.2 Définition et caractéristiques principale	10
3.3 Applications :	12
3.4 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées :	13
3.4.1 Activité acidifiante :	13
3.4.2 Production de métabolites d'intérêt :	13
3.4.3 Propriétés enzymatiques :	13
3.4.4 Propriétés spécifiques aux probiotiques :	14
3.4.5 Critères de performance :	14
3.5 Microbiologie du lait camelin et ces dérivés :	14
4. GENRE <i>LACTOCOCCUS</i> :	15
4.1. Habitat et rôle :	19
4.2. Métabolisme azotés chez les lactococques :	22
a. Besoins azotés :	22
4.3. <i>Lactococcus</i> et les conditions de croissance :	23
4.4. Rôle de <i>Lactococcus lactis</i> dans la fabrication du fromage :	23
5. LES MILIEUX DE CULTURES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES DANS LE LAIT	24
5.1. Le lait milieu de culture :	25
5.2. Milieux pour lactocoques :	25
5.3. Autres milieux :	27
6. LES ANTIBIOTIQUES	28
6.1. Définition :	28
6.2. Triméthoprimé :	29
6.3. Rifampicine :	29
CHAPITRE II : Matériels et méthodes	
1. MATERIEL :	30
1.1. Echantillonnage :	30
1.2. Milieux de culture :	31
□ Géloses :	31

□ Bouillons :	31
□ Autre milieux :	31
1.3. Produits chimiques et réactifs :	31
□ Les colorants :	31
□ Les acides et les bases :	31
□ Alcool et autres :	31
□ Tampons :	31
1.4. Les antibiotiques :	31
1.5. Appareillage :	32
2. METHODE ANALYTIQUE :	32
2.1. Test de la réductase :	32
2.2. Analyse microbiologique :	33
2.2.1. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux :	33
2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide :	34
2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :	36
2.2.4. Recherche de spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs et de <i>Clostridium perfringens</i>	37
2.2.5. Dénombrement de staphylococques dorés:	38
2.2.6. Dénombrement des entérobactéries	38
2.2.7. Dénombrement des bactéries lactiques	38
3. ISOLEMENT DES BACTERIES LACTIQUES : (MISE EN EVIDENCE D'UN MILIEU SPECIFIQUE POUR LE GENRE <i>LACTOCOCCUS</i>)	39
3.1. Choix de milieu de culture :	39
3.2. Préparation chimique de l'antibiotique :	39
3.3. Préparation des dilutions :	40
3.4. Caractérisation préliminaires des isolats :	40
3.5. Démembrement de la flore lactique totale :	41
3.6. Analyse microscopique :	41
3.7. Tests physiologiques et biochimiques :	41
a. Recherche de la catalase :	41
b. Type fermentaire :	41
c. Culture sur lait de Sherman :	41
d. La thermorésistance :	42
e. Tolérance au pH alcalin :	42
f. Culture sur milieu hypersalé :	42
g. Croissance à différentes températures :	43
h. Hydrolyse de l'esculine :	43
i. Recherche de l'arginine Di-hydrolase (ADH) :	43
j. Test de production d'acétoïne :	44
k. Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose):	45
l. Test d'hémolyse :	45
m. La galerie API Strep :	45
n. L'utilisation des carbohydrates :	46
3.8. Conservation des souches :	47
3.9. Traitement statistique des résultats :	47
4. ETUDE DE LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION ET DE CROISSANCE	47
4.1. En culture pure :	47

signifie que chaque souche est prise séparément.....	47
4.1.1. Préparation de la culture :	47
4.1.2. Mesure du pH et dosage de l'acidité titrable :	48
4.1.3. Evolution de la biomasse :	49
4.2. En culture mixte :	49
5. DOSAGE DE LA SOMME DU DIACETYLE-ACETOÏNE PRODUIT PAR LA SOUCHE MR32 EN CULTURE PURE ET EN CULTURE MIXTE AVEC LES DEUX SOUCHES MT63 ET MT45	50
CHAPITRE III : Résultats et interprétations	
1. QUALITE HYGIENIQUE :	52
1.1. Test réductase :	52
1.2. La flore microbienne de lait cru de chamelle :	52
1.2.1. La flore mésophile aérobie totale :	52
1.2.2. Les entérobactéries :	53
1.2.3. Les coliformes :	54
1.2.4. Les streptocoques fécaux :	55
1.2.5. Germes pathogènes :	56
1.2.6. La flore lactique :	57
2. CHOIX DE L'AGENT SELECTIF :	58
3. CHOIX DE MILIEU DE CULTURE :	59
3.1. Dénombrement de la flore lactique totale :	60
4. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES	62
4.1. Aspect macroscopique :	62
4.2. Aspect microscopique :	63
5. IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES :	65
6. RESULTATS DES CINETIQUES :	77
6.1. Cinétiques des souches : (MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) en culture pure..	77
2.6. Cinétique des souches (MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) en culture mixte ...	81
DISCUSSION GENERALE	83
CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	95
BIBLIOGRAPHIE :	96
ANNEXES	



Introduction

INTRODUCTION :

En Algérie, le dromadaire occupe une place primordiale dans les zones arides et semi arides, en raison de son excellente adaptation aux mauvaises conditions de vie, tels que le manque d'eau et de pâturage. Malgré toutes ces contraintes, il est apte à produire un lait de bonne qualité contenant des lipides, du lactose, des protéines des sels minéraux, des vitamines et de l'eau en quantité suffisantes et équilibrées, la composition du lait camelin peut cependant varier selon le stade de lactation. De nos jours, les besoins en lait sont de plus en plus importants vu que ce produit peut être consommé à l'état frais, mais aussi sous forme pasteurisé, stérilisé ou transformé en produits dérivés (Laiyhier, 2011, Rasolofo, 2010).

Le lait de chamelle, comme celui des autres mammifères, est un milieu de composition chimique et physique complexe permettant au chamelon de couvrir ses besoins énergétiques et nutritionnels pendant la première étape de son existence (Kamoun et Ramet, 1989). Il possède un certain nombre de particularités liées à sa composition physico-chimique, biochimique et microbiologique. Parmi ces particularités, on signale sa teneur relativement élevée en vitamine C et en niacine (vit. B3). Sa composition en éléments minéraux paraît plus riche que celle du lait de vache surtout en Calcium et en Potassium (Sboui *et al.*, 2009).

La microflore du lait cru est composée essentiellement de bactéries. Ces dernières peuvent être Gram positives ou Gram négatives. La microflore technologique est utile à l'industrie agro-alimentaire. Parmi les groupes lactiques importants, se révèlent les *Lactocoques* qui sont d'une grande importance à l'échelle industrielle et sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme souches «starter». Ils sont dans la production de fromage, de laits fermentés vu la difficulté de l'isolement de cette souche et son importance illustre dans le domaine agro-alimentaire. En effet, les milieux de cultures destinés à l'isolement sélectif des bactéries d'importance technologique sont peu disponibles dans la littérature, particulièrement pour le genre *Lactococcus*.

L'essor d'un milieu de culture favorisant le développement des espèces de *Lactococcus* passe nécessairement par une meilleure compréhension des conditions de développement, de la physiologie cellulaire et du métabolisme de ces microorganismes.

D'après nos connaissances, un milieu sélectif pour les lactocoques reste peu décrit dans la littérature. De même, les milieux entreprises sont utilisés afin d'étudier cette population et non pas pour l'isolement sélectif car ils permettent la croissance de d'autres micro-organismes

ayant la même morphologie et même morphotype de colonie que les lactocoques. C'est pour cette raison que cette étude prend tout son importance, en ce sens qu'elle a pour but de :

*Etudier la qualité hygiénique et l'efficacité du système protecteur du lait camelin collecté localement (Ghardaia, Biskra, Djelfa, El-Bayadh, Khenchla, M'sila Naâma).

*Rechercher à caractériser un milieu qui permet l'isolement le développement du genre *Lactococcus*, la mise en évidence d'un milieu spécifique nécessite, entre autre une bonne connaissance de ce genre bactérien et des autres genres exhibant les même caractéristiques et une perception de leur résistance/sensibilité vis-à-vis aux antibiotiques. L'inhibition de développement des souches ayant des colonies présentant la même morphotype est réalisée par l'addition des deux antibiotiques la rifampicine et le triméthoprime.

* Etudier la caractérisation technologique des souches identifiées de *Lactococcus lactis* « les cinétiques de croissance et d'acidification en culture pure et mixe entre les souches de même genre dans le milieu lait »

*Etudier la production des composés aromatiques acétoine-diacétyl.

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

- Le premier chapitre fait référence à une bibliographique faisant le point du dromadaire, le lait de chamelle, la microbiologie du lait, les bactéries lactiques et le genre *Lactococcus*.
- Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes d'échantillonnage, la qualité hygiénique du lait collecté, mise en évidence d'un milieu de culture spécifique pour l'isolement du genre *Lactococcus* et l'identification des souches isolées (biochimique, technologique).
- Dans le troisième chapitre nous faisons état des résultats obtenus et leurs interprétations. Une discussion générale est suivie d'une conclusion et de perspectives sont proposées conjointement à la conclusion. Enfin, nous avons indexé au présent travail des références bibliographiques et des annexes.

CHAPITRE I
Revue
Bibliographique

CHAPITRE I : Revue bibliographique

1. LE DROMADAIRE :

En milieu aride le dromadaire est un animal domestiqué, au même titre que d'autres ruminants (zébu, mouton, chèvre, cheval et âne), pour ses productions, sa contribution aux ressources d'un milieu à faible productivité, ses mises-bas, son lait, sa viande et son travail sont très appréciés par son éleveur, dont la vie en dépend dans le milieu désertique (Faye, 1997).

Les caractéristiques anatomiques des camélidés les classent dans une famille zoologique bien définie et différente de celle des bovidés. La famille des camélidés appartient à l'embranchement des vertébrés, classe des mammifères ongulés et sous classe des placentaires. Dépourvus de cornes et de vésicule biliaire, les zoologues américains mettaient le dromadaire dans la classe des mammifères ongulés, ordre des Diplathra (articulation double) et sous-ordre des Artiodactyles -doigts pairs- (Prat, 1993). Cette famille du sous-ordre des ruminants ne comprend que deux genres : *Camelus* et *Lama*. Le genre *Camelus* comprend 2 espèces :

-*Camelus bactrianus* (chameau de Bactriane) chameau à deux bosses

-*Camelus dromedarius* (dromadaire) chameau à une bosse.

Depuis 1985, Mukasa-Mugerwa classe le dromadaire appartient comme suit:

Classe : Mammifères

Sous-classe : Placentaires

Ordres : Artiodactyles

Sous ordres : Ruminants

Famille : Camylidae

Groupe : Tylopodes

Genre : *Camelus*

Espèce : *Camelus dromedarius*

Quant à Gauthier-Pilters (1981), il rapporte que les ancêtres des camélidés actuels apparaissent au tertiaire en Amérique du nord. D'après Yagil (1984), ces proto-camélidés

migrèrent d'Amérique du nord vers les autres parties du monde et s'éteignirent dans leur lieu d'origine.

Le dromadaire ou son ancêtre très proche serait arrivé, il y a 2 ou 3 millions d'années, en Afrique par le Sinaï, occupant la Corne de l'Afrique puis l'Afrique du nord jusqu'à l'Atlantique (Correra, 2006 ; Yagil, 1984). Cet animal est le mieux adapté aux régions chaudes à climat subdésertique et désertique des domaines méditerranéen, tropical et subtropical. Ces régions sont caractérisées par la rareté de l'eau et par une végétation spontanée éparse (Peyre de Fabregues, 1989).

1.1. Alimentation du dromadaire :

Les pâturages sahariens sont classés en 2 catégories : permanents et éphémères.

-Les plantes vivaces, charnues très résistantes à la sécheresse dont les feuilles sont réduites à l'état d'articles ou d'épines. Cette végétation spéciale forme le fond de la nourriture de dromadaire que les nomades appellent le « bois ». Elles constituent le pâturage permanent du dromadaire ;

-les petites plantes annuelles et éphémères sont composées principalement, de crucifères, de graines, de légumineuses, de malvacées, de géraniacées et de résédacées qui germent après les pluies dans les endroits qui paraissent en temps habituel les plus impropres à la végétation. (Balla, 2011)

1.2. Importance du dromadaire :

Le dromadaire joue un rôle socio-économique primordial dans les sociétés pastorales nomades, dont il fournit des ressources alimentaires appréciables par sa viande, sa graisse, son lait. Ses urines ont un rôle thérapeutique en servant au traitement de certaines maladies. Sa peau, sa laine constituent des matières premières pour l'artisanat. Avec les excréments du dromadaire, les pasteurs font du feu et/ou préparent des pansements. Ces excréments constituent également des fertilisants naturels pour les parcours pastoraux (Cottin, 2000 ; Diallo, 1989 ; Lhote, 1987). Mais son emploi essentiel est de servir de monture (selle), de tracter des charrues plus particulièrement sur les terrains sablonneux. Sa force est aussi mise à profit pour puiser l'eau des puits, et pour le bâti. Enfin, il assure des communications régulières entre les différents groupes humains, contribuant ainsi à faire sortir de l'isolement

total un pays, ce qui lui a valu d'être surnommé le "vaisseau du désert" par plusieurs auteurs dont Peyre de Fabregues (1989).

1.3 Répartition géographique :

Le dromadaire est répertorié dans 35 pays "originaux" qui s'étendent du Sénégal à l'Inde et du Kenya à la Turquie. Par contre, le chameau de Bactriane (à deux bosses) ne supporte pas la chaleur. Vers le nord son habitat ne connaît de limites que celles que lui impose l'absence de nourriture. Il n'est présent que dans une zone étroite localisée de la Turquie à la Chine et qui comprend à peine une dizaine de pays.

L'effectif est d'au moins 20 millions de "grands camélidés" (regroupant seulement les dromadaires et les chameaux) dont un peu plus d'un million de chameaux de Bactriane (Faye, 2002). Près de 80 % de la population de dromadaires se situe en Afrique où l'essentiel des effectifs est concentré dans les pays de la Corne (Somalie, Ethiopie, et Djibouti, Kenya, Soudan) qui abritent environ 60 % du cheptel camelin mondial. La Somalie, à elle seule, avec ses 6 millions de dromadaires, possède près de 50 % du cheptel africain, ce qui lui vaut vraisemblablement l'appellation de "pays du chameau". L'économie cameline est également importante en Afrique de l'ouest notamment en Mauritanie où l'effectif est passé de 700 000 têtes en 1966 à 1.247 000 têtes en 2001 de. Le dromadaire a aussi été introduit dans d'autres régions comme l'Australie où il vit actuellement à l'état sauvage. Il y est essentiellement concentré dans les zones méridionale et occidentale du pays (Faye, 1997).

Estimé à 268.560 têtes en 2005, l'effectif camelin algérien est réparti sur 17 wilayas, avec 75% du cheptel dans huit wilayas sahariennes : Ouargla, Ghardaïa, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Béchar et 25% du cheptel dans neuf wilayas steppiques : Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila (Siboukeur, 2007).



*Figure 1. Répartition géographique des principales races de dromadaires en Afrique du Nord.*⁵

(http://camelides.cirad.fr/fr/actualites/archives/dossier_mois13_15.html.)

1.4 Les races algériennes :

Les différentes races rencontrées en Algérie se retrouvent dans les trois pays d'Afrique du Nord; ce sont des races de selle, de bât et de trait. Il s'agit des races suivantes: Le Chaambi, L'Ouled Sidi Cheikh, le Saharaoui, l'Ait Khebbach, le Chameau de la Steppe, le Targui ou race des Touaregs du Nord, L'Aier, le Reguibi et le Chameau de l'Aftouh (Balla, 2011).

1.5. Production laitière :

La production mondiale de lait de chamelle est estimée officiellement à 1,3 millions de tonnes en 2002. Cependant, si on tient compte de l'autoconsommation et du réel potentiel moyen des animaux en production, il est probable que cette production soit plus élevée (soit 5,4 millions de tonnes). Les productions individuelles varient entre 1000 et 2700 litres par lactation en Afrique, mais peuvent **atteindre 7000 à 12 000 litres** selon certaines sources en Asie du Sud. Actuellement, la production nationale globale de lait camelin en algérie se situe entre **2,5 milliards à 3 milliards** de litres en 2015. ([6](http://almanach-</p>
</div>
<div data-bbox=)

dz.com/index.php?op=fiche&fiche=49). La courbe de lactation est comparable à celle des bovins avec une persistance meilleure. La durée de la lactation est très variable (de huit à 18 mois en général), soit des durées plus importantes en moyenne que les vaches laitières dans les mêmes conditions (Faye, 2003). Cette variabilité des rendements laitiers observés est liée à celle de divers facteurs tels que la quantité et la qualité de l'alimentation disponible, conditions climatiques, fréquence de la traite, rang de mise bas et l'état sanitaire. (Yagil et Etzion, 1980 ; ; Ismail et Al-Mutairi, 1998 ; Khanna *et al.*, 1998 ; Simpkin *et al.*, 1997).

2. LE LAIT DE CHAMELLE :

Le lait de chamelle est beaucoup plus répandu et représente la ressource alimentaire la plus importante pour les sociétés pastorales nomades.

2.1. Composition et propriété physico-chimique du lait :

Le lait de dromadaire, à l'observation visuelle, est d'une couleur blanche mat, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène. Il est amère (Ramet, 2003), est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé. Le pH du lait camelin se situe autour 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 centipoises (Hassan *et al.*, 1987) et un point de congélation variant de $-0,53$ à $-0,61^{\circ}\text{C}$. Sa teneur en eau est de 87,3 (Kamoun, 1994).

Le lait de chamelle a un taux de caséine totale un peu plus faible dans le lait que dans le lait de vache; il représente 75 à 79 pour cent de la matière protéique contre 77 à 82 pour cent pour le lait de vache (Mehaia, 1987). La matière grasse du lait est caractérisée par la dimension des globules gras; ceux-ci sont de petite taille; ils possèdent une enveloppe membranaire importante et apparaissent fortement liés aux protéines (Farah *et al.*, 1990 ; Knoess *et al.*, 1986), et une composition en acides gras pauvre en acides à courtes chaînes; la proportion en acides palmitique et stéarique est au contraire élevée. Les propriétés physiques des triglycérides se caractérisent par des points de fusion plus bas et de solidification plus élevés, que pour la matière grasse du lait de vache (Abu-leiha, 1987; Farah et Ruegg, 1989). Sa composition minérale diffère peu de celle du lait de vache (Ellouze et Kamoun, 1989). Il y a toutefois un peu moins de sodium, de calcium et de phosphore, et plus de chlore et de Potassium, mais il se caractérise néanmoins par des taux plus élevés en oligo-éléments (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Pb) (Bengoumi *et al.*, 1994 ; Mehaia *et al.*, 1995)

La composition en vitamines du lait de dromadaire diffère de celle du lait de vache par une teneur en vitamine C supérieure; le taux de vitamine A est beaucoup plus faible et de plus très variable de 12,9 U.I. /100 g de lait à 50,0 U.I./100 g . Il en est de même de la teneur en riboflavine et en vitamine B12.

2.2 Propriété médicinale :

Le lait de chamelle est supposé porteur de vertus diététiques et thérapeutiques qui en font un produit de qualité. En effet, traditionnellement, des propriétés antibiotiques, anti-infectieuses, anti-cancéreuses, antidiabétiques, des effets prophylactiques et reconstituants chez les malades en convalescence sont attribués au lait de chamelle. Au Kazakhstan, le lait de chamelle fermenté (shubat) est utilisé pour le traitement de la tuberculose, de la gastro-entérite, des ulcères gastriques et pour l'alimentation des nourrissons (Konuspayeva *et al.*, 2004). En Inde, des auteurs (Agrawal *et al.*, 2003) ont montré l'effet hypoglycémiant et régulateur de glycémie du lait de chamelle chez 12 diabétiques insulinodépendants buvant ce lait en plus de leur traitement. Cela s'est traduit par une diminution de la demande en insuline chez ces patients après trois mois de cure laitière. Les facteurs «santé» attribués au lait de chamelle et ses produits transformés peuvent être liés à certains de ses composants :

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

Le lysozyme constitue un facteur antimicrobien puissant dans le lait, sa quantité est plus élevée que dans le lait de vache, 15 µg 100 ml⁻¹ contre 7 µg 100 ml⁻¹. L'activité enzymatique du lysozyme du lait de chamelle est également plus forte que celle de la vache, mais plus faible que celle de l'oeuf (Elagamy *et al.*, 1996). Tout comme la lactoferrine de cette espèce, le lysozyme du lait de chamelle est thermorésistant. A 85 °C pendant 10 minutes, le lysozyme du lait de chamelle ne représente plus que 44 pour cent de la valeur initiale, contre 26 pour cent pour le lait de vache et 18 pour cent pour le lait de bufflesse dans les mêmes conditions (Elagamy, 2000).

Les Immunoglobulines (IgG) jouent un rôle dans le système immunitaire chez les nouveau-nés. Trois classes fonctionnelles sont définies chez le dromadaire. Du point de vue structurale, les IgG du dromadaire sont plus proches des immunoglobulines humaines

que de celles des autres ruminants. Sa teneur répertoriée dans le lait de chamelle est quatre fois supérieure à celle de la vache à 0 °C, et six fois plus élevée à 65 °C. Par ailleurs, les IgG sont plus thermorésistantes: il ne reste que 0,048 mg/ml d'IgG dans le lait de chamelle à 85 °C alors qu'elles disparaissent complètement dans le lait de vache (Elagamy, 2000).

La lactoperoxydase est une enzyme qui appartient aux systèmes non-immuns normaux de la défense du lait. Elle est considérée comme étant une des plus thermorésistantes par rapport au lait de vache. Son Poids Moléculaire est de 78000 (Elagamy *et al.*, 1996). Par ailleurs, cette enzyme présente une stabilité encore plus forte vis à-vis des traitements thermiques. Elle est, par exemple, fortement active dans les échantillons du lait pasteurisé de la laitière de Mauritanie (Sabumukama, 1997). Elle possède encore une activité à forte température (Loiseau *et al.*, 2001). Quant à la vitamine C, elle est très présente dans le lait de chamelle où son rôle tonique permet la lutte contre la fatigue et l'infection. Son taux moyen est trois fois plus élevé dans le lait de chamelle que celui de la vache (Elkhidir, 2002). Son rôle biologique est considérable vue ses propriétés antioxydantes (Konuspayeva *et al.*, 2004).

2.3 Propriété technologique et produits fermentés :

Comparé au lait de vache : le lait de chamelle est pauvre en caséines, protéines responsables de la consistance du lait coagulé et l'équilibre minéral de ce lait, en particulier, amplifie son inaptitude à la coagulation. Le lait de dromadaire offre une résistance plus marquée aux fermentations lactiques. La matière grasse du dromadaire est riche en acides gras insaturés et plus particulièrement en acide palmitoléique ce qui fait que le point de fusion de cette matière grasse est relativement bas. En plus de cela, la taille des globules gras est relativement petite.

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

Pendant ces dernières décennies, les travaux menés sur ce lait ont permis de mieux cerner les difficultés et de les contourner en usant de quelques modifications des procédés utilisés. C'est ainsi que des essais concluants de transformation du lait de chamelle en produits dérivés ont été rapportés par plusieurs auteurs, notamment pour la fabrication du lait

en poudre (Abu-lehia, 1994), beurre (Farah *et al*, 1989; Rüegg et Farah, 1991), fromage (Kamoun et Bergaoui, 1989 ; Mohamed *et al*, 1990 ; Kamoun, 1990 et 1995), yaourt ainsi que le lait fermenté (Farah *et al*, 1990 ; Abu-Tarboush, 1996 et 1998) et crème glacée (Abulehia *et al*, 1987) (Siboukeur, 2007).

En milieu pastoral, le lait de chamelle est très prisé à l'état frais. Il est aussi transformé en lait fermenté car l'obtention de beurre ou de fromage est très difficile. Pourtant Faye (1997) rapporte que les Touareg du Mali et du Niger ont trouvé des présures spécifiques qui permettent la transformation du lait de chamelle en fromage. En Mauritanie, le lait chamelle pasteurisé et le fromage sont vendus dans les villes comme Nouakchott. Par contre Au Kazakhstan, les possibilités de garder les produits frais sont rares. Traditionnellement, on commercialise de préférence des produits laitiers fermentés. Le lait de vache fermenté en Asie centrale s'appelle aïran (ou kefir en russe), shubat au Kazakhstan, le chal et doïran au Turkménistan, le khoormog en Mongolie. Le koumis est le produit de la fermentation du lait de jument. Le lait de yak fermenté commercialisé au Kirghizistan s'appelle kourout. Il existe aussi une espèce de fromage dur dénommé kourt (Konuspyeva *et al.*, 2003). Tous ces dérivés laitiers nécessitent l'utilisation des ferments lactiques pour leurs fabrication.

3. BACTERIES LACTIQUES :

3.1 Découverte des bactéries lactiques :

Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des bactéries lactiques, elles avaient été utilisées dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (Paul rosse *et al.*, 2002). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Des travaux de certains auteurs ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (De Roissart et Luquet, 1994).

3.2 Définition et caractéristiques principale

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Ce groupe de bactéries, regroupe des bacilles et des coques. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement GRAM positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, et ne possédant pas de catalase (certaines souches

possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (Axelsson., 1998 ; Holzapfel *et al.*, 2001 ; Gevers, 2002).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes),
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),
- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Vandamm *et al.*, 1996).

Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (Figure 02) (De Roissart et Luquet, 1994).

Du fait de l'amplitude de cette définition, plusieurs genres de bactéries appartiennent à cette famille : *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella* (POT, 2008). Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments (Vandamme *et al.*, 1996 ; Gevers, 2002 ; Patrignani *et al.*, 2006).

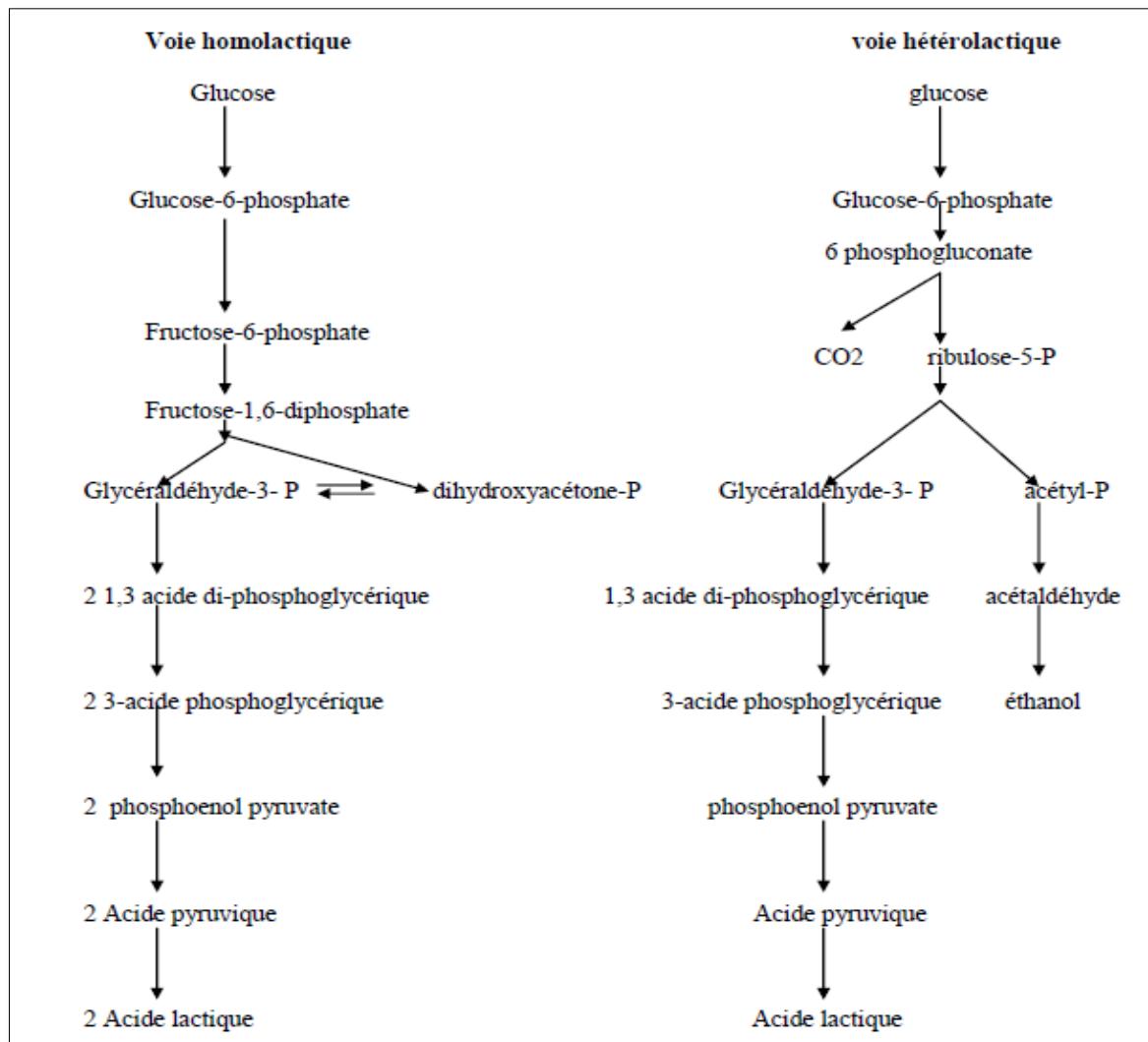


Figure 2. Dégradation du glucose par les bactéries lactiques (De roissart et Luquet, 1994).

3.3 Applications :

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle. Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits. Les saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques

commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Daly *et al.*, 1998 ; Hugenholtz *et al.*, 2002). La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (Mayra-Makinem et Bigret, 1998). Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Wisselink *et al.*, 2002). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines (Rodriguez *et al.*, 2003) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (Langella *et al.*, 2001).

3.4 Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées :

L'utilisation des bactéries lactiques ou probiotiques pour une application industrielle donnée, est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes :

3.4.1 Activité acidifiante :

La transformation du lactose (ou d'un autre sucre assimilable) en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (Frank et Hassan, 1998 ; Mayra-Makien et Bigret, 1998).

3.4.2 Production de métabolites d'intérêt :

Selon les espèces et selon les souches, les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites tels que l'acide acétique, l'éthanol, des arômes (diacétyl, acétaldéhyde...), des bactériocines (activité antimicrobienne), des exo polysaccharides, des enzymes (protéases, peptidases, lipases...) et du CO₂ (formation d'ouvertures dans les fromages) (Beal *et al.*, 2008 ; Frank et Hasssan, 1998 ; Mayra-Makien et Bigret, 1998) .

3.4.3 Propriétés enzymatiques :

Les activités protéolytiques et peptidasique sont importantes car elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu. L'activité lypolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (Beal *et al.*, 2008).

3.4.4 Propriétés spécifiques aux probiotiques :

En plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (Da Cruz et al., 2007 ; Ouwehand et al., 2002). De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche, principalement en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques.

3.4.5 Critères de performance :

Indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité, éthanol, chlorure de sodium) (Beal et al., 2008).

3.5 Microbiologie du lait camelin et ces dérivés :

Des analyses microbiologiques de lait de chamelle du Sud- Ouest algérien ont montré que les genres bactériens rencontrés étaient représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Parmi les coques homofermentaires des souches s'apparentent à *Enterococcus faecalis* et des souches s'apparentent à *Lactococcus*. Ces dernières, qui résistaient à 6,5% de NaCl, ce qui les distingue des espèces habituellement décrites dans la littérature, ont été identifiées à *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Les coques lactiques hétérofermentaires appartenaient aux espèces *Leuconostoc dextranicum* et *Leuconostoc lactis*. Les lactobacilles identifiés appartenaient tous à l'espèce *Lactobacillus plantarum* (Zadi Karam et Karam., 2006).

Hassaine et al., 2008 ont aussi analysés le contenu bactérien du lait de chamelle cru de trois races de dromadaire au sud algérien (Réguibi, Targui, N'ajjer) et ont pu identifier les espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Trois bactéries lactiques nommées *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus pentosus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* avec un potentiel probiotique ont été isolés à partir du lait camelin pasteurisé au Kuwait (Yateem et al., 2008).

L'analyse de la qualité microbiologique du Garris, produit fermenté domestique soudanais de lait de chamelle, a permis d'isoler et d'identifier les souches appartenant aux genres suivant :

Lactococcus, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Ces souches sont *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* (Abdel Moneim et al., 2006).

Une analyse microbiologique de lait de dromadaire produit au Maroc a permis de caractériser des bactéries lactiques suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum* (Khedid et al., 2009).

Par ailleurs, des analyses microbiologiques récentes du shubat réalisées au CIRAD, ont montré que huit souches bactériennes appartenant à quatre types de bactéries lactiques intervenaient de façon différenciée sur la fermentation du lait de chamelle: *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*. Ces résultats laissent penser qu'il est possible de piloter les processus fermentaires pour obtenir des produits différenciés mieux standardisés (Aussel, 2002).

4. GENRE *LACTOCOCCUS* :

Les lactocoques se présentent sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de 0,5 à 1mm de diamètre formant des chaînes de longueur variable

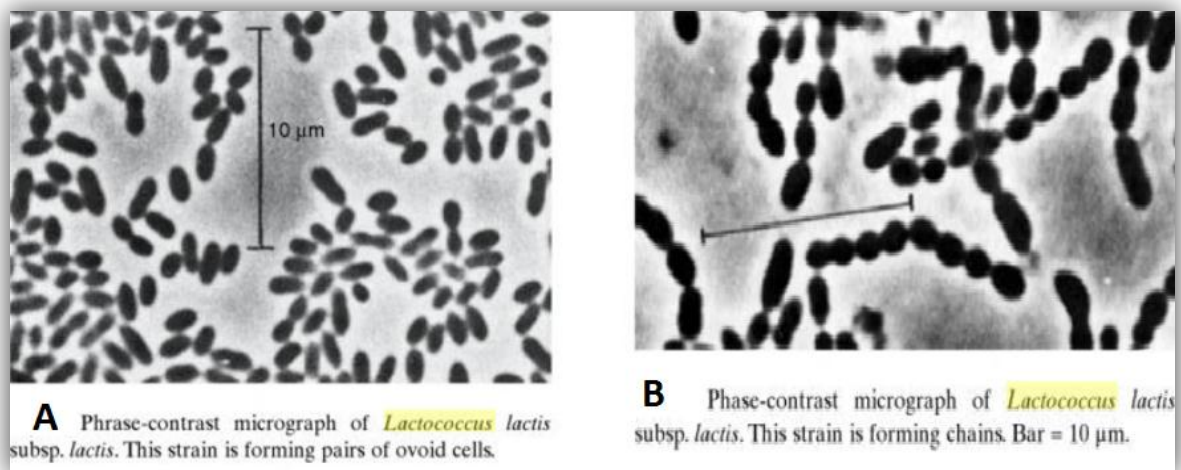


Figure 3. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (A), et en chaînette (B) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « Lactique ». Car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires ne possèdent aucun caractère pathogène.

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires produisant exclusivement de l'acide L (+) lactique. Seule *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Dans certaines conditions cependant, ces bactéries peuvent présenter un métabolisme diversifié, appelé métabolisme mixte, au cours duquel des quantités importantes de formiate, d'acétate et d'éthanol sont produites (Figure 04). Les produits du métabolisme mixte sont pourtant plus inhibiteurs que le lactate. Le métabolisme mixte a d'abord été observé par Thomas (1995) lors de cultures de *L. lactis* en mode continu.

Les espèces du genre lactocoques se distinguent par la présence dans leur enveloppe d'antigène du groupe N par leur caractère faiblement hémolytique mais non pathogène pour la plupart par leur température de croissance minimale inférieure à 10°C et optimale voisine de 30°C par leur thermo-sensibilité et leur inaptitude à croître en présence de 6.5% de NaCl et à pH=9.6 (Schleifer *et al.*, 1985).

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.

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces. Les trois espèces suivantes sont utilisées dans l'industrie 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 certains 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 à 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 *L. lactis* se sous-divise en quatre sous-espèces, soit *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. lactis* ssp.

lactis et *L. lactis* subsp. *tructae* ssp. nov. (Perez *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2002; Schleifer *et al.*, 1985), seulement *L. lactis* subsp. *cremoris* et subsp. *lactis* peuvent être isolées de l'environnement laitier et sont couramment utilisées pour la fabrication de babeurre, de crème sûre et de fromage. Des études récentes ont démontré que la sous-espèce *L. lactis* ssp. *lactis* pouvaient aussi être isolée des végétaux (Siezen *et al.*, 2007), de l'appareil urogénital féminin (Gao *et al.*, 2011) et du système gastro-intestinal de certains poissons d'eau douce et du mucus intestinal de la truite brune (*Salmo trutta*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Perez *et al.*, 2011). ces quatre sous-espèces peuvent facilement être différenciées sur la base de plusieurs caractéristiques phénotypiques (e.g. croissance en présence de 4 % de NaCl, utilisation de différents sucres, sensibilité à divers antibiotiques) (Perez *et al.*, 2011; Schleifer *et al.*, 1985).

Les deux sous espèces de *Lc. lactis* : *Lc.lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* se distinguent essentiellement par leur capacité acidifiante et leur sensibilité à la température. La sous- espèce *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est incapable de pousser au- dessus de 37°C. Le biovar *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, utilise le citrate, produit du diacétyle, de l'acétoïne et du CO₂ (Chamba, 2000).

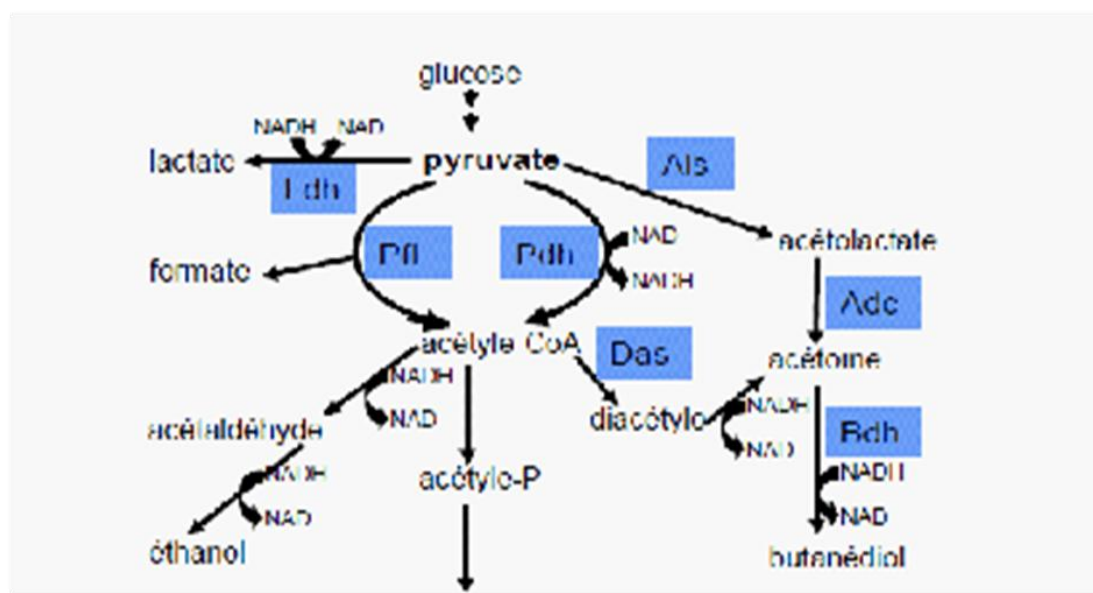


Figure 4. Métabolisme du pyruvate chez *L. lactis*.

Ldh : lactate déshydrogénase, Pdh : pyruvate déshydrogénase, Pfl : pyruvate-formate-lyase, Als : acétolactate synthase, Adc : acétolactate décarboxylase, Bdh : butanédiol déshydrogénase, Das : diacétyl synthase. (Christel Garrigues *et al.*, 1998).

Tableau 1. Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994).

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. hordniae</i>	+	-	+	-		-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	v
<i>Lc. plantarum</i>		+	+	v	-	-	L(+)	-	v	-	+
<i>Lc. raffinolactis</i>		-	+	-		-	L(+)	v	+	-	+

Tableau 2. Caractéristiques physiologique et biochimique du genre *Lactococcus* (De Roissart et Luquet, 1994).

ESPECES	Mobilité	Pigmentation jaune	Croissance dans/à							Gaz à partir du glucose	Hydrolyse de :		
			NaCl 3%	NaCl 4%	NaCl 6,5%	pH 9,6	10°C	40°C	45°C		Gélatine	Esculine	Hippurate
<i>Lc. garvieae</i>	-	-		+			+	+	-	-		+	V
<i>Lc. lactis ssp. Cremoris</i>	-	-	+	-			+	-	-	-		V	+
<i>Lc. lactis ssp. hordniae</i>	-	-	+	-				-		-		+	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	-	-		+			+	+	-	-		+	+
<i>Lc. piscium</i>	-						+	-		-		+	
<i>Lc. plantarum</i>	-	-		+			+	V	-	-	-	+	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	-	-		-			-	-		-	-	+	-

Tableau 3. Profil fermentaire du genre *Lactococcus* (De Roissart et Luquet, 1994).

ESPECES	Production d'acide par fermentation de :									
	amygdaline	L-arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Saccharose	D-Xylose
<i>Le. garvieae</i>	+	-	+		+	+	V	V	V	-
<i>Le. lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	-	-	+		+	+	-	V	V	V
<i>Le. lactis</i> spp. <i>hordniae</i>	-	-	+		-	-	-	V	+	V
<i>Le. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	V	-	+		+	+	+	V	V	V
<i>Le. piscium</i>	+	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Le. plantarum</i>	+	-	+		-	-	+	+	+	-
<i>Le. raffinolactis</i>	V	V			+	+	+	V	+	+

V : variable

4.1. Habitat et rôle :

Le terme « habitat » signifie le milieu naturel où vit un organisme. Dans un habitat, on distingue les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques qui déterminent les réactions, les adaptations physiologiques et parfois même morphologiques de l'organisme et qui à l'inverse se modifie par la présence de l'organisme. « Les facteurs abiotiques » considérés généralement comme le milieu, sont de nature physicochimique : la lumière, la température le pH la disponibilité de l'eau, la teneur en nutriment en oxygène etc. « Les facteurs biotiques » sont déterminés par la présence d'autres organismes de même espèce ou d'espèces différentes, qui exerce une complémentarité ou une concurrence en modifiant les facteurs abiotiques, par l'utilisation ou la transformation des substrats, la production de substrats stimulants ou de substrats inhibitrices.

Les caractéristiques métaboliques d'un micro-organisme jouent un rôle important dans le choix de son habitat, on peut en définir un ou plusieurs, pour chaque espèce bactérienne qui occupe en général qu'un seul habitat par écosystèmes. Mais il peut arriver que des bactéries appartiennent à la même espèce se trouvant dans plusieurs habitats.

Rappelons qu'un écosystème est un système biologique complexe, formé de divers organismes vivant ensemble (biocénose) dans un milieu donné (biotope), et constitué par conséquent un fragment de la biosphère.

Les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physicochimiques et biologique dans certains écosystèmes, elles sont dominantes, dans d'autres elles sont minoritaires, mais capables d'exercer des effets bénéfiques ou plus rarement des altérations biologiques (Dellaglio *et al.* 1994) en plus leurs grandes exigences nutritionnelles les associent à des environnements naturels particulièrement riches (végétaux, produits laitiers et carnés).

Les représentants du genre *Lactococcus* sont les bactéries lactiques les plus importantes d'un point de vue commercial, sont principalement isolées des végétaux et de la peau des animaux.

Les lactocoques se trouvent en grande quantité dans le lait cru et une large gamme de produits laitiers tels que le beurre et les laits fermentés, et de nombreuses variétés de fromages (soit parce qu'ils y ont été ajoutés comme levains, soit parce que les Produits laitiers ont été fabriqués à partir de lait cru à des températures favorables au Développement des lactocoques.

Les végétaux sont le réservoir naturel des lactocoques laitiers. Ces derniers sont utilisés depuis longtemps dans les levains ont perdu certains phénotypes et acquis d'autres phénotypes suite à la domestication de lactocoques issus de végétaux (Bachmann *et al.*, 2012).

Les lactocoques isolés de végétaux ont par la capacité à fermenter une plus large variété de glucides et à produire plus de composés d'arôme, une autotrophie pour un nombre d'acides aminés supérieur, et une plus forte tolérance aux stress (Nomura *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2007).

Tableau 4. Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des exploitations agricoles (Teuber et Geis, 2006)

Sample	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	New, undefined <i>Lactococcus</i> sp.
Cheese plant					
– cheese milk	+	+			
– cheese whey	+	+			
– waste whey	+	+	(+)		
– wastewater tank	+	+	+	+	+
– wastewater disposal site soil	(+)	(+)		(+)	
– grass	(+)	(+)	(+)	(+)	
Farm samples					
– raw milk	+	+	+	+	+
– milk machine	+	+			
– udder	+	+			
– Saliva, cow	(+)	(+)			
– Saliva, bull	(+)				
– skin, cow	(+)		(+)		
– skin, bull	(+)		(+)		
– grass		(+)		(+)	
– soil	(+)		(+)	(+)	
– silage	(+)				

+ = detected by direct plating; (+) = detected by plating after enrichment.

Tableau 5. Les lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers (Teuber et Geis, 2006).

Type of product	Composition of starter culture
1. Cheese type without eye formation (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 to 98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2 to 5%
2. Cottage cheese, quarg, fermented milks, cheese types with few or small eyes (e.g., Edam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%; or <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85 to 90%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%
3. Cultured butter, fermented milk, buttermilk, cheese types with round eyes (e.g., Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70 to 75%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. "diacetylactis," 15 to 20%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2 to 5%
4. Taette (Scandinavian ropy milk)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
5. Viili (Finnish ropy milk)	<i>Oidium lactis</i> (covers surface); <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
6. Casein	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
7. Kefir	Kefir grains containing lactose-fermenting yeasts (e.g., <i>Candida kefir</i>), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranoformans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

*The quantitative composition has been taken from the culture catalog of a major worldwide supplier.

4.2. Métabolisme azotés chez les lactococques :

a. Besoins azotés :

Les bactéries lactiques, ont des besoins nutritionnels complexes, notamment en ce qui concerne les fractions azotées du lait, car elles sont incapables d'effectuer la synthèse totale des acides aminés à partir d'une source azotée plus simple. Dans le lait, elles peuvent disposer de composés de bas point moléculaire et des protéines, caséine notamment (Desmazeaud, 1996).

Dans études systématiques, portant sur les besoins azotés en acides aminés, ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus*. Ces études sont fondées sur la technique d'omission individuelle de chacun des éléments du milieu (Reiter et Oram, 1962), pour déterminer les auxotrophies de plusieurs souches de *Lactococcus lactis*. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées, possèdent au moins des auxotrophies pour le glutamate, la valine, la leucine, l'isoleucine la méthionine et l'histidine.

L'étude de la détermination des exigences nutritionnelles de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* montre que la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL 1403 isolée d'un milieu laitier était auxotrophe pour neuf acides aminés et cinq vitamines. En revanche, la souche NCDO 2118 isolée d'un milieu végétal est, d'après la technique d'omission individuelle, prototrophe vis-à-vis des acides aminés, mais exige pourtant six acides aminés et cinq vitamines pour sa croissance. À partir du milieu minimum contenant ces six acides aminés, la suppression du glutamate provoque un temps de latence d'environ 48 h avant le début de la croissance, et une diminution de moitié du taux. Ces résultats indiquent que le problème de biosynthèse est restreint à la fabrication du glutamate. Le temps de latence considérable nécessaire pour la synthèse du glutamate s'est avéré être reproductible et observé aussi bien sur milieu complet que sur milieu minimum (Loubière *et al.*, 1997).

La définition donc de prototrophie/auxotrophie est en partie dépendante de la composition du milieu de culture.

4.3. *Lactococcus* et les conditions de croissance :

Les bactéries lactiques, et en particulier *Lactococcus lactis*, jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits.

La croissance des bactéries en général, et de *Lactococcus lactis* en particulier, dépend des conditions nutritionnelles (sources de carbone et d'azote.) et physico-chimiques (pH, Température, salinité.).

Les conditions de culture en laboratoire sont souvent optimisées et Contrôlées pour assurer une croissance rapide. A l'inverse, *Lactococcus lactis* dans son habitat naturel (plantes, sol) ou lors de sa mise en œuvre dans les processus Industriels, doit faire face à de multiples stress nutritionnels ou physico-chimiques (Thermique, oxydatif, acide, osmotique) parfois concomitants (Bunthof *et al.*, 1999 ; Sanders *et al.*, 1999 ; Stuart *et al.*, 1999).

En effet, *L. lactis* est soumis à de fortes variations de températures dans le sol ou lors de la fabrication de fromages tels que le cheddar, pour lequel la température monte jusqu'à 40°C. A l'inverse, la température est beaucoup plus faible pendant l'affinage (8-16°C) ou le stockage du fromage. De même, la production de lactate dans les levains provoque, quant à elle, une acidification croissante du milieu (lait). Dans ce cas, les bactéries sont elles-mêmes à l'origine du stress acide. La pression osmotique est également susceptible de varier significativement, notamment lors du pressage. Cette étape peut également conduire à une limitation carbonée par l'élimination du lactose dans le Lactosérum (Stuart *et al.*, 1999).

Les mécanismes de perception du stress, essentiels pour que la cellule puisse se protéger avant que les effets de ce stress ne soient irréversibles, sont encore peu connus chez *Lactococcus lactis* mais semblent se faire chez les autres bactéries, soit au niveau membranaire, soit au niveau du cytoplasme (Rallu, 1999).

4.4. Rôle de *Lactococcus lactis* dans la fabrication du fromage :

Lactococcus lactis est la seule espèce de lactocoques utilisée industriellement en fromagerie,

Le groupe des levains mésophiles, auquel les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait, à travers leur métabolisme

homofermentaire, et à produire des arômes. Les lactocoques sont utilisés dans la majorité des technologies fromagères où ils peuvent constituer le seul ensemencement en bactéries lactiques (Chamba ,2000).

La fabrication d'un fromage résulte d'un ensemble de phénomènes physico-chimiques et biochimiques de transformation du lait par une flore microbienne et/ou par l'action de présure. Les levains lactiques sont capables de fermenter les sucres en lactate entraînant la coagulation du lait, mais également de produire de nombreux autres composés comme des polysaccharides, des arômes ou encore des agents antibactériens (bactériocines). Ainsi, les fonctions technologiques résultant de l'action de ces micro-organismes touchent aussi bien la texture que les aspects organoleptiques, nutritionnels et sanitaires du produit fini, ainsi que sa conservation (Raynaud, 2006).

5. LES MILIEUX DE CULTURES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES DANS LE LAIT :

Les bactéries lactiques sont présentes dans le lait cru, les produits laitiers tels que les fromages, les yaourts et le lait fermenté.

Ces bactéries lactiques ont un effet probiotique et un intérêt technologique ou médical, elles sont réputées pour avoir de nombreuses et complexes exigences nutritionnelles qui rendent parfois leurs cultures fastidieuses en laboratoire.

L'isolement, le comptage et la caractérisation parfaite de ces bactéries sont nécessaires.

De nos jours, il existe plusieurs milieux sélectifs pour isoler les bactéries lactiques. Des outils sont également disponibles pour les caractériser au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche.

Les milieux sélectifs ont une implication dans la favorisation de développement d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (tel que les milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Leur composition la composition d'un milieu de culture adéquat doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend :

- Des substrats nutritifs : acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, ...,
- Un système tampon assurant la constance du pH
- Des sels minéraux,
- Des vitamines,
- D'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes : protéines, acides aminés, vitamines supplémentaires.

5.1. Le lait milieu de culture :

Contrairement à ce que l'on pourrait supposer, le lait n'est pas un milieu de culture optimum pour les bactéries lactiques. Par exemple une simple addition d'extrait de levure stimule leur production d'acide lactique. Julliard *et al.* (1995) en étudiant la croissance de *Lc .lactis* subsp. *cremoris* E8 et AM2 dans le lait ont obtenu, en fin de croissance, une densité cellulaire de l'ordre de 3.10^7 soit 50 fois plus faible que celle normalement atteinte dans un milieu synthétique ; d'autre part, on constate depuis longtemps, des variations journalières ou saisonnières importantes dans l'activité des ferments lactiques cultivés dans le lait, indépendamment des caractéristiques des souches et de toute action inhibitrice due aux bactériophages ou aux antibiotiques. Les variations sont généralement attribuables à des différences d'aptitude du lait au développement des bactéries lactiques qui sont particulièrement exigeantes du point de vue nutritionnel.

5.2. Milieux pour lactocoques :

Deux milieux de culture sont généralement utilisés pour faire pousser en laboratoire les lactocoques. Il s'agit des milieux Elliker (Elliker *et al.*, 1956) et M17 (Terzaghi & Sandine, 1975).

Le premier sert à isoler et à énumérer les lactocoques, tandis que le deuxième sert plutôt à faire croître ces derniers. Dans les dernières années, le milieu M17 est devenu un standard dans les études génétiques des lactocoques (Teuber, 1995). Le milieu M17 contient habituellement les ingrédients suivants : digestion pancréatique de caséine, peptone de soya, extrait de levure, extrait de bœuf, acide ascorbique, P-disodium glycérophosphate (GP), sulfate de magnésium ($MgSC^{\wedge}$) et eau. C'est le pouvoir tampon du GP (ce qui le distingue du milieu M16) qui permet globalement une meilleure croissance et qui réduit les dommages et la mort des cellules qui sont causés par le faible pH obtenu (dû à l'acide lactique produit) avec d'autres milieux de culture. Habituellement, une exposition prolongée à un milieu acide altère

l'intégrité de la paroi cellulaire et peut tuer la cellule. De plus, cela peut encourager la perte de plasmides possédant des gènes codant pour une activité importante. L'incorporation de GP dans un milieu de culture minimise la perte de ces activités et la mort cellulaire (Terzaghi et Sandine, 1975).

Les autres ingrédients de ce milieu de culture ont également des rôles importants. Les peptones et les dérivés de viande servent de sources de carbone, d'azote, de vitamines et de minéraux. L'extrait de levure ainsi que l'acide ascorbique stimulent la croissance bactérienne. Finalement, le sulfate de magnésium fournit les ions essentiels à la croissance. Habituellement, du lactose est ajouté au milieu M17 afin de conserver l'habilité des lactocoques à l'utiliser. En effet, l'information génétique permettant l'utilisation de ce sucre est située dans un plasmide chez *L. lactis* (Thompson & Gentry-Weeks, 1994).

KCA et Turner (Turner, 1963 ; Waes, 1968) pour tester le pouvoir réducteurs des souches de *Lactococcus* Le milieu KCA s'est avéré être le plus sélectif vers lactocoques (Gemelas, *et al.*, 2013), FSDA (gélose différentielle Rapide Lent) ; PCA (Plate Count Agar) additionné de lait (1%) (Huggins et Sandine., 1984) ont pour but de séparer les souches protéolytiques des celles qu'elles ne le sont pas, Milieu Elliker modifié ; et milieu de Chalmers sont des milieux sélectifs qui mettent en évidence les bactéries acidifiantes (Chamba,*et al.* 1981; Vanos et Cox, 1986) .

Des composé sont parfois ajoutés aux milieux de culture comme l'ajout de l'azure sodique inhibiteur de bactéries gram négatif, l'indicateur l'acidité (pourpre de bromocrésol) est parfois ajoutés au PCA ou à la gélose M17 afin d'améliorer leur efficacité dans la détection de LAB et surtout lactocoques (Desmaures and Gueguen, 1997).

Différent milieux culture ont était testé (Gemilas *et al.*,2013) sur 8 souches afin de mettre en évidence leur capacité dans l'évaluation de la population de *Lactococcus* dans le lait cru .

Le milieu M17(Terzaghi et Sandine.,1975), M17 Nal (Gemilas *et al.*,2013), Elliker (Elliker *et al* 1956), Elliker modifié (Chamba .,1981), PCA + lait (Desmaureset Gueguen.,1997), KCA modifié (Waes.,1968), Chalmers modifié (Vanos et Cox.,1986), Turner (Turner.,1963),FSDA (Huggins et Sandine.,1984) .les résultats ont que le **Milieu KCA et turner** se sont avéré les milieux les plus sélectifs pour les espèces du genre *Lactococcus* comme le montre dans le Tableau 06 :

Tableau 6. Milieux de culture pour la croissance de micro-organismes importants en laiterie (harddy ,1987).

Micro-organisme	Température	A	Milieu
<i>Lactococcus lactis</i>	3	0.	Elliker
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3	0.	Elliker
<i>Lactobacillus heveticus</i>	3	0.	MRS
<i>Propionibactérium shermatii</i>	3	0.	Lait peptoné
<i>Micrococcus lactis</i>	3	0.94 à 0.97	Surface fromage
<i>Oospora lactis</i>	3	0.94 à 0.97	Surface fromage
<i>Penicillium camemberti</i>	2	0.	Lactosérum gélosé
<i>Mucor sp</i>	2	0.	Lactosérum gelosé

Tableau 7. Résultats de la croissance des 18 souches (GEMELAS et al., 2013) sur huit milieux de culture (FSDA, Elliker modifié, M17 NaCl, PCA + lait, Elliker, Chalmers modifié, KCA modifié, Turner et sur le milieu du M17 modifié).

Souches	A	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	L	m	n	o	p	q	R
FSDA	A	A	A	A	A	A												
Elliker Modifié				A										A	A	A	A	
M17																		
M17NaI																A		A
PCA+lait																		
Elliker																		
Chalmers Modifié									A				A	A		A		
KCA modifié							A	A	A			A	A	A	A			
Turner							A	A	A				A	A	A			A

A : absence de croissance ; couleur grise : croissance **a** : *Lc. lactis*, **b** : *Lc. cremoris*, **c** : *Lc. hordniae*, **d** : *Lc. plantarum*, **e** : *Lc. garvieae*, **f** : *Lc. diacetylactis*, **g** : *Ln. mesenteroides*, **h** : *Ln dextranicum*, **i** : *Ln cremoris*, **j** : *Ec. faecalis*, **k** : *Ec. faecium*, **l** : *Ec. durans*, **m** : *Lb. platarum*, **n** : *lb. paracasei*, **o** : *St. thermophilus*, **p** : *E. coli*, **q** : *Ps. fluorescens*, **r** : *S. aureus*.

5.3. Autres milieux :

Le milieu de Mac Cleskey (pour les bactéries lactiques gazogènes); le milieu de Reddy ; Milieu lait tournesolé (Guiraud, 1998).

6. LES ANTIBIOTIQUES

6.1. Définition :

Les antibiotiques : Depuis celle donnée par Waksman en 1942, la définition d'un antibiotique a connu plusieurs évolutions. A l'heure actuelle, le terme antibiotique désigne toute substance naturelle ou synthétique, d'origine microbienne ou dérivée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la viabilité des microorganismes (Zomathoun, 2005).

Les antibiotiques agissent à faible doses et doivent présenter certains caractères pour être actifs sur les microorganismes : ils doivent présenter tout d'abord dans la cellule, ensuite rencontrer leur cible et perturber la physiologie bactérienne, et ils ne doivent subir aucune transformation capable de les inactiver au cours de leur contact avec la cellule (Ogawara, 1981 ; Zomahoun, 2005).

Tableau 8. Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et leur mécanisme d'action (Archambault, 2004)

Mécanismes d'action	Mécanismes d'action spécifiques	Antibiotiques ou classe d'antibiotiques
Membrane cellulaire	Modification mouvement ions monovalents (Na^+ , K^+) et divalent (Ca^{2+}) à travers la membrane	Ionophores ^a
	Interaction avec les phospholipides de la membrane augmentant ainsi la perméabilité	Polypeptides ^b
Synthèse ADN	Formation d'un complexe stable avec ARN pol ADN-dépendante	Rifampicine
	Liaison avec ADN gyrase	Quinolones
Synthèse de la paroi	Liaison aux précurseurs D-Ala-D-Ala du peptidoglycan	Glycopeptides
	Inhibition des enzymes transpeptidases et PBP nécessaires à la synthèse du peptidoglycan	Pénicillines
	Inhibe déphosphorylation d'un lipide pyrophosphate	Bacitracine
	Liaison avec PBP empêchant la synthèse du peptidoglycan	Céphalosporines
Synthèse protéique	Fixation à la sous-unité 30S du ribosome	Aminoglycosides
	Fixation à la sous-unité 50S du ribosome	Macrolides, Lincosamides, Pleuromutiles
	Fixation irréversible des sous-unités 50S et 70S du ribosome	Streptogramines
	Transport actif à travers membrane et liaison à la sous-unité 30S du ribosome	Tétracyclines
	Fixation à la sous-unité 50S du ribosome et empêche transpeptidation	Phénicoles
Substitution par analogues métaboliques et synthèse anormale du PABA	Interférence avec production acide folique par inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase	Triméthoprim
	Interférence avec synthèse acide folique par compétition avec le PABA en utilisant l'enzyme dihydroptéroate synthétase	Sulfamides

6.2. Triméthoprine :

Triméthoprine est un agent antimicrobien à large spectre utilisé largement dans le monde entier, seul ou en combinaison avec le sulfaméthoxazole pour le traitement d'entérique, respiratoire, la peau et les infections des voies urinaires. Les entérocoques sont généralement sensibles in vitro au triméthoprine.

6.3. Rifampicine :

C'est un antibiotique appartenant à la catégorie des antibiotiques qui agissent au niveau des acides nucléiques la famille des rifamycine ce sont des antibiotique bactéricides ils se fixent sur l'ARN polymérase en formant un complexe irréversible ce qui bloque la formation de l'ARN messenger (Zoumahou,2005)

CHAPITRE II
Matériel et méthodes

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran1 Ahmed Benbella, durant la période Septembre-Juin 2014.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Qualité sanitaire des échantillons.
- Milieu spécifique d'isolement du genre *Lactococcus*.
- Isolement et identification des souches isolées.
- Etude des aptitudes technologiques de ces bactéries lactiques.
- Constitution de ferments mixtes et étude de leurs propriétés technologiques.

1. MATERIEL :

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

1.1. Echantillonnage :

Les échantillons de lait utilisés proviennent de troupeaux de chameaux de 7 régions du pays : El-bayadh, Djelfa, Ghardaïa, Naâma, M'sila, Béchar et Biskra.

Le lait a été traité à partir de chameaux sains, puis il est recueilli dans de bonnes conditions hygiéniques. Les échantillons du lait sont mis dans des flacons préalablement stérilisés, conservés et transportés dans une glacière au laboratoire où ils sont analysés.

Tableau 9. Echantillons de laits de chameaux collectés.

N° de l'échantillon	Période deCollecte	Région	Race
Ech1	Novembre 2013	Khayter « Bogtob-El-bayadh »	Sahraoui
Ech2	Janvier 2014	Djelfa	Oueld-Sidi-Cheikh
Ech3	Janvier 2014	Ghardaya	Targui
Ech4	Janvier 2014	Mechria « Naâma »	/
Ech5	Février 2014	Sidi Aissa « M'sila »	/
Ech6	Février 2014	Béchar	Sahraoui
Ech7	Mars 2014	Sidi Khaled « Biskra »	/

1.2. Milieux de culture :

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

- **Géloses :**

PCA, MRS (de Man-Rogosa et Sharp), gélose au sang de cheval, M16BCP, KMK, M17, ELLIKER lactosé, S-S, V-F, Mac Conky, Chapman, BEA.

- **Bouillons :**

BLBVB, Eau peptoné, Elliker lactosé liquide, Bouillon hypersalé 4% 6,5%, Evalitsky, Roth, eau physiologique .

- **Autre milieux :**

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

1.3. Produits chimiques et réactifs :

- **Les colorants :**

Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, bleu de méthylène, Phénolphthaléine,

- **Les acides et les bases :**

La soude dornic N/9, HCl, acide trichloroacétique (TCA) 5% ;

Les réactifs : réactifs de Vogues Proskauer (VPI et VP II),

- **Alcool et autres :**

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

- **Tampons :**

Tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

1.4. Les antibiotiques :

-Triméthoprim ; Rifampicine

1.5. Appareillage :

Bec Bunsen ;	Anse de platine ;
Vortex électrique ;	Autoclave ;
Réfrigérateur ;	Balance analytique ;
pH mètre ;	Four Pasteur ;
Centrifugeuse ;	Bain Marie ;
Microscope optique ;	Micropipettes ;
Agitateur électrique ;	Balance de paillasse ;
Etuves	

2. METHODE ANALYTIQUE

2.1. Test de la réductase :

Ce test permet une évaluation de la qualité microbiologique, il se fait grâce à l'épreuve au bleu de méthylène qui consiste à ajouter au lait cru une substance colorée (le bleu de méthylène), qui le colore en bleu et qui donne par réduction un leuco dérivé incolore. La rapidité de changement de coloration du mélange (lait-bleu de méthylène) incubé à 37°C est fonction du nombre de bactéries présentes (Nait Mouloud, 2009).

Tableau 10. Estimation de la charge bactérienne par l'épreuve au bleu de méthylène (Nait Mouloud, 2009).

Décoloration	Nombre bactéries/ml	Qualité du lait
5 heures ou plus	10^5 à 2×10^5	Bonne
2 à 4 heures	2×10^5 à 2×10^6	Bonne à passable
Moins de 2 heures	2 à 10×10^6	Insuffisante

2.2. Analyse microbiologique :

-L'objectif assigné à cette partie du travail vise à étudier quelques groupes microbiens susceptibles de faire partie de la flore originelle et de contamination, du lait camelin à sa réception.

▪ Préparation des déluions décimales :

La solution mère a été préparée en prélevant 1 ml lait cru de chaque échantillon qui a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette solution mère, des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-6} ont été effectuées.

▪ Etude de la flore microbienne :

Nous avons procédé dans cette étude à des observations macroscopiques, microscopiques et au dénombrement de quelques groupes susceptibles d'évoluer dans l'échantillon de lait de chamelle cru.

Les ensemencements ont été réalisés en triple exemplaires, On ne tient compte que des boites contenant un nombre convenable c'est-à-dire compris entre 25 et 250 colonies par boite (kihal *et al.*, 2007).

2.2.1. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux :

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-6} à 10^{-4} , porter aseptiquement 1 ml dans une boite de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose PCA fondue puis refroidie.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur paillasse.

Incubation :

Les boites seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 heures avec :

- première lecture à 24 heures,
- deuxième lecture à 48 heures,
- troisième lecture à 72 heures.

Lecture :

Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse.

Dénombrement :

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide :

Les coliformes sont dénombrés en milieu liquide par technique du NPP (nombre le plus probable) à l'aide du bouillon BLBVB (bouillon lactosé billé de vert brillant) réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de Durham.

La technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- le test de présomption : réservé à la recherche des Coliformes totaux.
- le test de confirmation : appelé encore test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des Coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.
- *Test de présomption.*

Préparer dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif (BLBVB) à raison de trois tubes par dilution.

A partir des dilutions décimales 10^{-5} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée.

Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche),

- un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady qui se trouve en annexe.

- *Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.*

Les tubes de BLBVB trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage dans :

- un tube de BLBVB muni d'une cloche,
- un tube d'eau peptonée exempte d'indole.

Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- un dégagement gazeux dans les tubes de BLBVB,
- un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia Coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte du fait qu'Escherichia Coli est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

Remarque :

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par la technique du NPP (nombre le plus probable).

La technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- le test de présomption : réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe,
- le test de confirmation : réservé à la confirmation proprement dite sur milieu Litsky, des tubes trouvés positifs au niveau des tests de présomption.

- Test de présomption :

Préparer dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution.

A partir des dilutions décimales 10^{-5} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

Mais il n'y a aucun dénombrement à faire à ce niveau.

- *Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.*

Chaque tube de Rothe trouvé positif lors du test de présomption fera l'objet d'un repiquage dans un tube de milieu EVA Litsky.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- un trouble microbien,
- une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte uniquement des tubes d'EVA Litsky positifs ou négatifs.

2.2.4. Recherche de spores d'Anaérobies Sulfite-Réducteurs et de Clostridium perfringens :

Préparation du milieu :

Faire fondre un flacon de gélose Viande foie, le refroidir dans un bain d'eau à 45°C puis ajouter une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de sulfite de sodium.

Mélanger soigneusement et aseptiquement.

Le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45°C jusqu'au moment de l'utilisation.

Ensemencement :

Les tubes contenant les dilutions 10^{-2} et 10^{-1} seront soumis :

- d'abord à un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes,
- puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet, dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.

A partir de ces dilutions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, dans chaque tube Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes.

Incubation :

Ces tubes seront ainsi incubés à 37°C pendant 16, 24 ou au plus tard 48 heures.

Lecture :

La première lecture doit se faire impérativement à 16 heures.

Dans le cas où il n'y a pas de colonie caractéristique ré-incuber les tubes et effectuer une deuxième lecture au bout de 24 heures voire 48 heures.

2.2.5. **Dénombrement de staphylococques dorés:**

Les bactéries halotolérantes se développent sur le milieu hypersalé de Chapman Mannitol Salt Agar (Marchal *et al.*, 1982). Ce milieu est retenu dans cette étude car il permet d'obtenir une croissance satisfaisante de la flore GRAM positif (Hassouna et Masrar, 1995).

L'ensemencement se fait en surface par étalement de 0.1 ml d'inoculum. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.2.6. **Dénombrement des entérobactéries**

Leur dénombrement sur milieu Mac conkey est effectué après ensemencement en profondeur et incubation à 37°C, pendant 24 à 48 heures.

2.2.7. **Dénombrement des bactéries lactiques**

Le dénombrement des bactéries lactiques s'est effectué sur le milieu de De Man Rogosa et Sharpe (MRS pH 6.8) (Marchal *et al.*, 1982 ; Guiraud, 1997). L'ensemencement est réalisé en profondeur en doubles couches. L'incubation à lieu à 30°C, pendant 72h (Larpent, 1997).

*Méthode de référence pour dénombrement de colonies en totalité

On ensemence deux boites par dilution ; dans le cas général, on prend en compte les boites contenant entre 25 et 250 colonies (Kihal *et al.*, 2007)

On calcule la moyenne pondérée N à partir des boites de deux dilutions successives $d1$ et $d2$ (au moins une boite doit contenir plus de 15 colonies : $c > 5$).

$$N = \Sigma c / (V \times (n1 + 0,1n2) \times d1)$$

N : nombre d'UFC (NE nombre estimé)

C : nombre de colonies dénombrées sur une boite ($c1$ pour la dilution $d1$ et $c2$ pour $d2$)

V : volume d'inoculum ensemencé sur une boite

$n1$: nombre de boites retenues à la première dilution (la plus faible)

$n2$: nombre de boites retenues à la deuxième dilution (la plus forte)

3. ISOLEMENT DES BACTERIES LACTIQUES : (MISE EN EVIDENCE D'UN MILIEU SPECIFIQUE POUR LE GENRE *LACTOCOCCUS*)

3.1. Choix de milieu de culture :

Des essais préliminaires ont été réalisés portant sur l'utilisation de plusieurs milieux de culture, et chaque milieu de culture est testé à son tour avec différentes concentrations de deux antibiotiques afin de maintenir le milieu de culture le plus adéquat à l'isolement de *Lactococcus*.

3.2. Préparation chimique de l'antibiotique :

* **Triméthoprim** (Fabriqué et conditionné par Hikma Farma Algeria B.P. N182400 Amman 11118-Jordani), 20 mg et 60 mg chacune est mises dans 40 ml d'eau distillée stérilisée à une concentration initiale (Ziane, 2008) de 0.5 mg/ml (Sandine *et al.*, 1991) et 1,5mg/ml respectivement, à l'aide d'un agitateur, on agite bien les deux solutions mères, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, ensuite auprès du bec Bunsen, la solution mère est stérilisée par filtration à travers des filtres poreux de 0.22µm aseptiquement, la solution mère est conservée à 4°C pendant une semaine.

1 ml de la solution mère prélevée est introduit dans chaque flacon contenant 100 ml de milieux gélosés M17 et Elliker additionnés du lactosérum, ensuite on coule rapidement nos milieux sur des boîtes par ensemencement en profondeur et on fait un geste de forme de huit.

* **Rifampicine** : (le fabriquant TUBILUX FARMA S.P.A –Via costarica pomezia- ROMA Italia, l'Exploitant laboratoire Théa), la solution de l'antibiotique est considérée comme solution mère contient une concentration de 30mg/10ml. A l'aide d'une micropipette auprès du bec Bunsen, 0.03ml, 0.15ml, 0.30ml et 0.60 ml correspondant respectivement aux concentrations initiales suivantes : 0,1mg, 0,2mg, 0,3mg sont ajoutées dans des flacons contenant 100ml milieu de culture gélose fondue (M17, Elliker) additionnés du lactosérum à 5%. Les concentrations essayées avant n'ont pas été retenue parce qu'il n'y a pas eu une croissance (2 mg/ml, 1,5mg/ml et 1mg/ml) pour la rifampicine (1,5mg/ml) pour le triméthoprim.

Après avoir maintenu le milieu adéquat l'isolement des bactéries lactiques a été poursuivi comme précité.

Chaque volume est prélevé de chaque solution mère d'antibiotique est introduit dans un flacon de gélose semi molle après on les coule rapidement dans des boites Petri contenant 1 ml d'inoculum.

3.3. Préparation des dilutions :

10 ml d'échantillon à analyser (lait cru de chamelle) ont été ajoutés dans 90 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} . Trois exemplaires pour chaque dilution 10^{-6} , et 10^{-7} , les dilutions ont été choisies de manière à obtenir un certain nombre de colonies convenables pour la détermination des bactéries lactiques. 1ml des dilutions 10^{-6} , 10^{-7} est prélevé pour être ensemencé en profondeur, puis on coule le milieu approprié, cette méthode est utilisée pour que les colonies s'éclatent librement et qu'elles soient facilement aperçues.

Un témoin est représenté par un milieu de culture M17 sans antibiotique et Elliker sans antibiotiques ensemencés et incubés dans les mêmes conditions. Les boites sont ainsi incubées à 30°C pendant 48 heures.

3.4. Caractérisation préliminaires des isolats :

Après avoir maintenu le milieu de culture adéquat, à partir des boites où la concentration des antibiotiques était 0,5mg/ml pour le Triméthoprim et 0,1mg/ml. 0,2 mg/ml et 0,3 mg/ml pour la Rifampicine.

Trois (3) colonies étaient prélevées au hasard présentant l'aspect macroscopique des bactéries lactiques (forme taille aspect et couleur (80 isolats au total)) et sont repiquées dans milieu M17 liquide puis incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation l'apparition d'un trouble indique la croissance des bactéries, 0.1 ml de chaque tubes positif est ainsi ensemencé par stries sur Elliker solide. Incubation à 30°C pendant 48h. Les colonies ainsi obtenues sont repiquées sur milieu Elliker solide afin de les purifier. L'identification des colonies obtenues sur les milieux contenant les antibiotiques a été établie par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

3.5. Démembrement de la flore lactique totale :

Le dénombrement de la flore lactique total a été réalisé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre UFC/ml} = \text{Nombre de colonies} \times 1/V \times 1/D.$$

V : étant le volume d'ensemencement et D étant la dilution prise en compte (Guiraud, 2003)

3.6. Analyse microscopique :

Après l'examen macroscopique des colonies sur les milieux nouvellement formés, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (voir annexes), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement, et de vérifier la pureté de la bactérie.

3.7. Tests physiologiques et biochimiques :

a. Recherche de la catalase :

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Ahmed et Irene, 2007).

b. Type fermentaire :

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par le lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence la fermentation de gaz (CO₂). C'est ainsi qu'on peut classer les bactéries lactiques en homo ou hétéro-fermentaires. Les souches sont cultivées dans des tubes contenant Elliker liquide avec une cloche de Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Kihal, 1996 ; Hariri *et al.*, 2009). Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 1% de CO₂. Les souches hétérofermentaires quant à elles, vont produire de l'acide lactique et du CO₂ à proportion égales, ce qui va être mis en évidence par la cloche de Durham qui se remplit de gaz (Carr *et al.*, 2002).

c. Culture sur lait de Sherman :

Les isolats purifiés sur Elliker liquide sont ensemencés dans deux séries de tubes contenant 9ml de lait écrémé stérilisé additionné de 1ml de bleu de méthylène à 1% pour la

première série et à 1ml de bleu de méthylène à 3% pour la deuxième série, Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h.

Le bleu de méthylène est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit , ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques , car vu que ce sont des microaérophiles,il ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques(aérobies) qui utilise tous l'oxygène de bleu de méthylène (Larpent *et al.*,1990), la décomposition du bleu de méthylène est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (Delarras , 2007). Ce dernier test permet aussi de différencier entre les espèces de lactocoques ainsi *Lc. lactis* est capable de pousser en présence de 0,3% de bleu de méthylène (Badis *et al.*, 2004). Et pour distinguer les streptocoques qui ne réduisent pas le bleu de méthylène des autres coques lactiques (Guiraud, 2003).

d. La thermorésistance :

Ce test destiné aux coques, il permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester sont préalablement réparties dans des tubes de milieu Elliker. Ces tubes sont par la suite exposés à un chauffage du bouillon ensemencé par une culture jeune à une température 60°C pendant 30min.

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

e. Tolérance au pH alcalin :

La croissance en milieu alcalin permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* (Devriese *et al* 1993). Le milieu utilisé est le bouillon Elliker ajusté à pH 9,6.

f. Culture sur milieu hypersalé :

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl.

Après une incubation à 37°C pendant 48h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (Guiraud, 1998). Ce test permet de séparer entre : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Un témoin est représenté par un tube contenant le milieu hyper salé non ensemencé est incubé dans les mêmes conditions.

g. Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer Les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du Bouillon Elliker par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux Températures 10°C, 40°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (Idoui *et al.*, 2009).

h. Hydrolyse de l'esculine :

L'hydrolyse de l'esculine est un des critères usuels de l'identification au sein de nombreux groupe bactériens. L'esculine est un hétéroside. Son hydrolyse, catalysée. Par une β - galactosidase et l'esculinase, libère du glucose et l'aglycone : l'esculétine. L'esculine produite réagit avec les ions de fer III pour former un précipité noir dans le milieu. Le milieu utilisé est la gélose à l'esculine milieu BEA bile esculine azide. (Dellaras, 2007) incubation pendant 24h à 30°C.

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

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, une gélose rapportée par Thomas (1973). Ce milieu contient du lactose (pas plus de 2mg/ml), de l'arginine (4mg /ml) et du pourpre de bromocrésol (0,05mg/ml) (voir annexes).

Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du lactose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

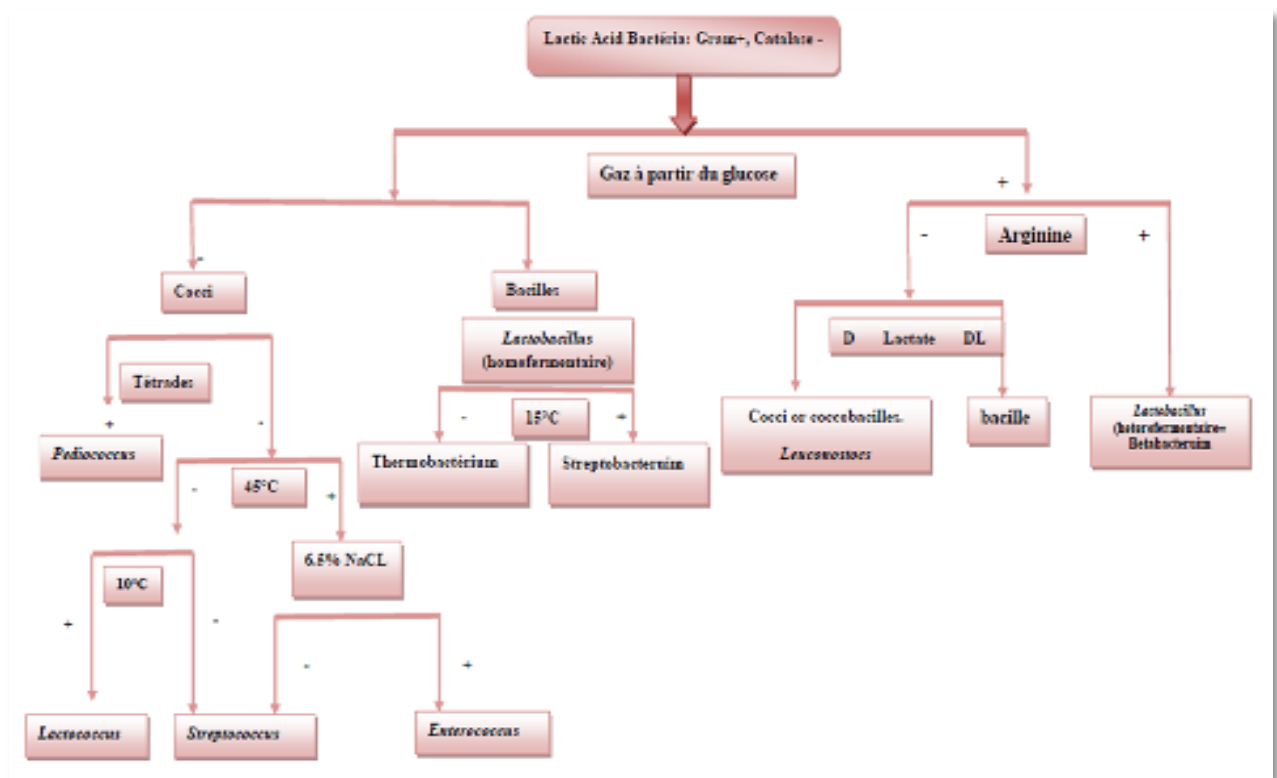
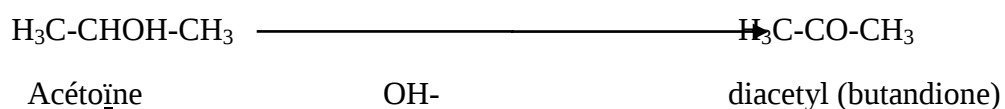


Figure 5 : Clé d'identification des bactéries à gram positif

j. Test de production d'acétone :

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'acétyl-méthyl-carbonilou acétoïne, un caractère d'intérêt taxonomique mais également industriel puisque le diacetyl (précurseur de l'acétoïne) est considéré comme une substance d'arôme importante dans la flaveur des produits laitiers, beurre et fromage. Sachant qu'il existe deux types de fermentations, la fermentation des acides mixtes et la fermentation butanediolique, ce composé est produit à partir du glucose, plus précisément à partir de l'acide pyruvique, il résulte d'une fermentation butanediolique après passage par l'acétaldéhyde et par le diacetyl.

En présence d'un hydroxyde (soude de potasse réactif VPI) l'acétoïne s'oxyde à l'air et le diacetyl (reformé), donne en présence de l'alpha-naphtol réactif VP II, une réaction colorée spécifique rouge-rose.



Le test consiste à ensemencer nos souches sur milieu Clark et Lubs, après une incubation à 45°C pendant 24 à 48h, on ajoute 5 gouttes du réactif VPI puis 5 gouttes du réactif VPIL.

On agite soigneusement les tubes à température ambiante (tubes ouverts pour permettre une bonne oxygénation)

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à rouge à la surface du tube.

k. Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose):

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et MC KAY (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation à 30°C). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

l. Test d'hémolyse :

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné. Il peut être Alfa hémolytiques (couleur verte autour des colonies); Beta hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou Gamma hémolytiques (le milieu n'est pas modifié) (Idoui *et al.*, 2009).

m. La galerie API Strep :

C'est un système à grand pouvoir discriminant elle comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activité enzymatique ou de fermentation des sucres.

Après du bec Bunsen on ouvre la boîte contenant galerie après avoir humidifié le couvercle avec de l'eau distillée stérile. Une colonie a été prélevée à partir d'une culture jeune et mise dans une ampoule d'API suspension (2ml) à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite on répartit la suspension 0,5 ml dans les micro-tubes. Les cupules de teste soulignées doivent être remplies avec l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe. La boîte est refermée et incubée à 30°C pendant 24h.

n. L'utilisation des carbohydrates :

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu sans extrait de viande et additionné de pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH (MRSBCP-EV), dont la seule source de carbone serait l'un des sucres : l'arabinose fructose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, saccharose et le D-xylose.

Les solutions sucres sont préparées à 3% et stérilisées. Un millilitre de solution de sucre est additionné à 10 ml de MRSBCP-EV. De ce fait, la plaque Elisa est utilisée pour ses puits, afin d'éviter l'utilisation de tubes à essai avec chaque souche étudiée, les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches.

Une solution bactérienne servant à ensemer les puits contenant les différentes sources de carbone a été préparée. Une culture de 18 heures de la souche appropriée est centrifugée à 8000 tr /min pendant 15min. le culot est récupéré et additionné de 2 ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur. A ce culot 5ml de milieu MRSBCM-EV est additionnée pour fournir la solution cellulaire servant à ensemer les puits de la plaque Elisa contenant différentes sources de carbone ; 0,1 ml de cette solution bactérienne est déposée dans chaque puits. La lecture des résultats se fait après 24 et 48h d'incubation (Guessas, 2007).

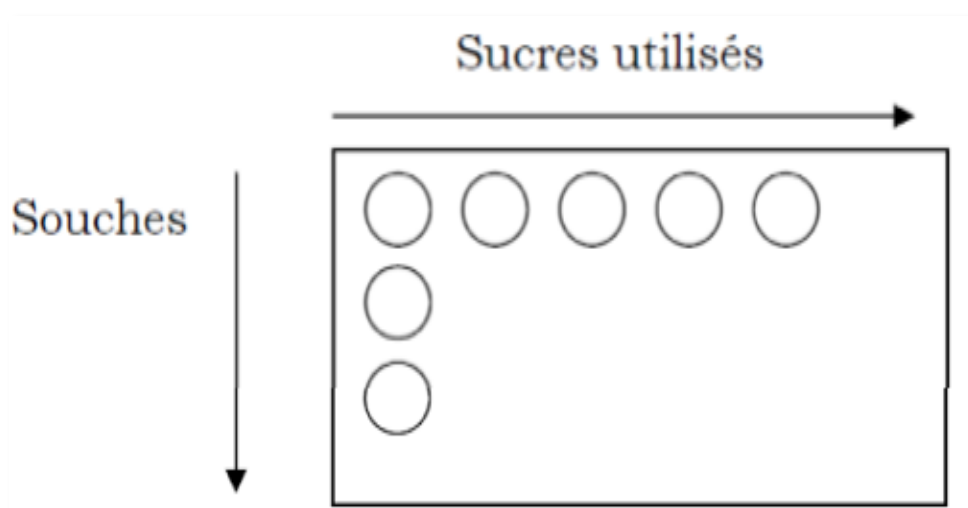


Figure 6: Schéma représentant la mini préparation pour le test de la fermentation des sucres (Guessas, 2007).

3.8. Conservation des souches :

Les souches sont ensemencées sur gélose Elliker inclinée en tube. Ces cultures sont gardées à 4°C. les repiquages se font toutes les deux semaines. Pour conservation de longue durée une culture de 18h est centrifugée (4000 tr /min pendant 10 min). Puis le culot est lavé. Le milieu de conservation est présenté par du lait écrémé auquel est additionnée du glycérol à 30% et 1% d'extrait de levure. La culture est conservée à -20°C pour longue durée.

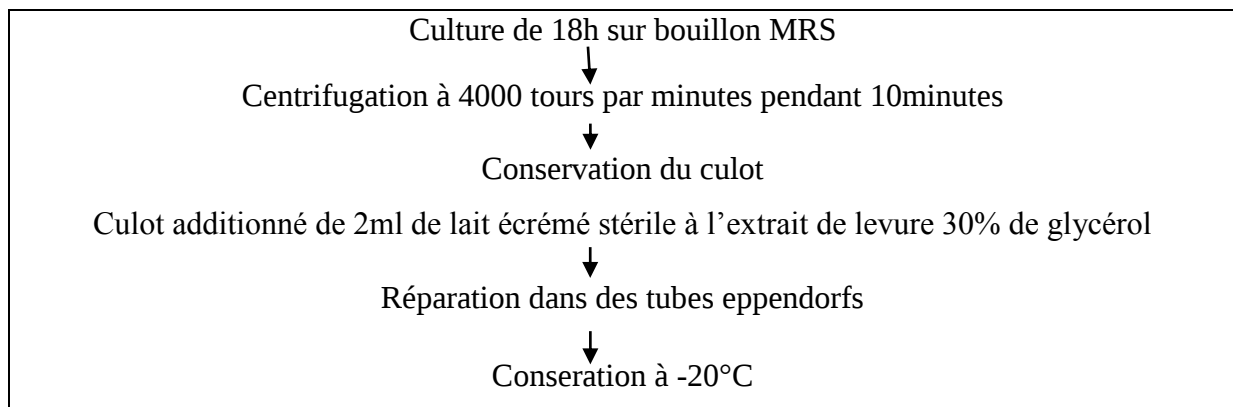


Figure 7: Schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi et al., 2002).

3.9. Traitement statistique des résultats :

Les données expérimentales de cette étude sont statistiquement discutées.

4. ETUDE DE LA CINETIQUE D'ACIDIFICATION ET DE CROISSANCE

4.1. En culture pure :

Signifie que chaque souche est prise séparément.

4.1.1. Préparation de la culture :

Les souches étudiées sont les suivantes : **MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28** isolées de lait cru de chamelle.

Ces tests ont été réalisés dans le lait écrémé qui est reconstitué à 10%, enrichi par 3 g/l d'extrait de levure et stérilisé à 110°C pendant 10 minutes.



La pré-culture est obtenue par l'inoculation du lait écrémé (10ml) par 100 µl de culture jeune (18h) à partir d'Elliker lactosé liquide.

Après l'incubation de 18h de la pré-culture à 30°C, chaque tube de 10 ml de lait écrémé reçoit 100 µl de cette pré-culture. L'incubation se fait à 30°C.

La cinétique d'acidification et de croissance est réalisée aux intervalles de temps suivants 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48h.

En retirant les tubes de chaque souche de 0h, et en mettant les restes à l'incubateur.

Chaque intervalle de temps, chaque tube de chaque souche va être sorti pour suivre le pH, évaluation de l'acidité, et le dénombrement et le dosage du diacétyle.

4.1.2. Mesure du pH et dosage de l'acidité titrable :

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

Afin de sélectionner des souches bactériennes satisfaisantes sur le plan technologique l'étude du pouvoir acidifiant est nécessaire.

La mesure de pH a été réalisée en utilisant un pH-mètre.

Selon la méthode d'Accolas *et al.* (1977), l'évaluation de l'acidité produite par les souches est réalisée par titrimétrie (titrage de 10 ml d'échantillon de culture avec NaOH N/9 (0.11mol/l) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine (à 1% dans l'éthanol) jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante pendant au moins 10 secondes, on note alors le volume de soude.)

Les résultats sont exprimés en degré dornic selon la formule suivante : (Guiraud, 1998)

Acidité= n x 10 dont n : volume de la soude dornic

1°D=0,1g d'acide lactique dans un litre de lait

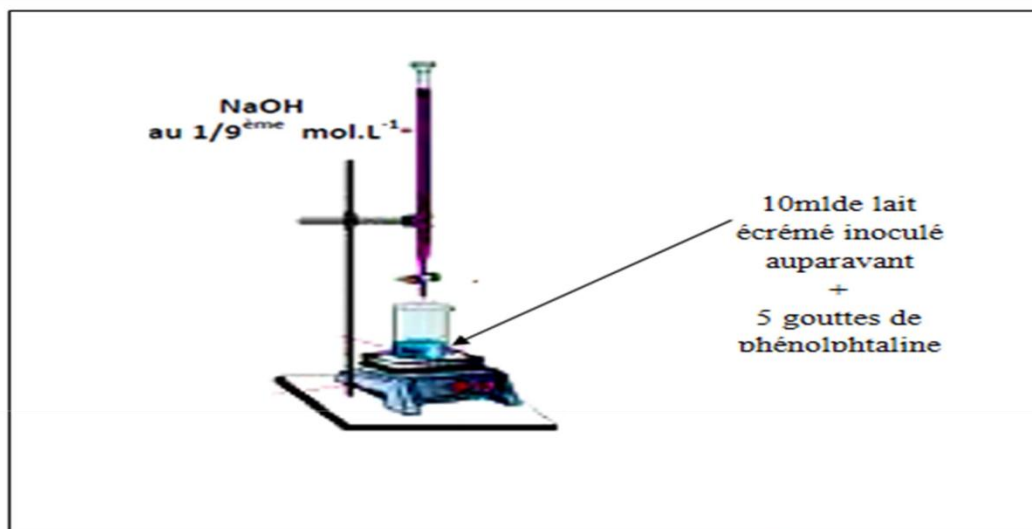


Figure 8 : Instruments pour la mesure de l'acidité titrable.

4.1.3. Evolution de la biomasse :

Après l'agitation à l'aide d'un vortex la culture pure en milieu lait, chaque intervalle de temps, des dilutions décimales et des dénombrements sur milieu Elliker lactosé gélosé ont été réalisés.

Les dilutions adéquats sont ensemencées en profondeur sur boîte de Pétri (3 boîtes par dilution). Seules les boîtes contenant un nombre de colonies compris en 25 et 250 sont retenues. (Kihal *et al.*, 2007) .

4.2. En culture mixte :

Les pré-cultures des trois souches citées « **MR32, MT63, MT45** » sont d'abord ensemencées sur le milieu lait écrémé pendant 18h.

- Cas des deux souches (**MR32** avec **MT63**) et (**MR32** avec **MT45**) :

50µl pour chacune des souches a été inoculée dans des tubes contenant 10 ml du lait écrémé qui est reconstitué à 10%, enrichi par 3 g /l de l'extrait de levure et stérilisé à 100°C pendant 10 minutes.

L'incubation se fait à 30°C.

Les cinétiques sont réalisées aux intervalles de temps suivants 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48h.

- Cas des trois souches (**MR32, MT63, MT45**) :

33µl pour chacune des trois souches a été inoculé dans des tubes contenant 10 ml de lait écrémé. (Les mêmes procédés que chez la cinétique en culture pure, précédemment notée).

Le dénombrement et l'évaluation de l'acidité et du pH ont été réalisés dans chaque intervalle de temps.

Ces tests (cinétique en cultures mixtes) ont été effectués simultanément avec les cinétiques de croissance et d'acidification en culture pure.

5. DOSAGE DE LA SOMME DU DIACÉTYLE-ACÉTOÏNE PRODUIT PAR LA SOUCHE MR32 EN CULTURE PURE ET EN CULTURE MIXTE AVEC LES DEUX SOUCHES MT63 ET MT45 :

Selon la méthode de Mathot (1992) qui permet, en milieu lait, de doser la somme de diacétyle-acétoïne produite.

Cette méthode repose sur le test Voges-Proskauer, rendu plus sensible par l'addition de créatine.

- 1 ml d'une pré- culture en milieu lait est additionnée par 1ml de TCA 2.5M et 1ml de NaOH 2.5M.
- Après incubation de 10min à + 4°C, la préparation est centrifugée à 10000tr pendant 20min.
- 0.05 ml de HCL 2.5N est ajoutée à 0.25 ml du surnageant récupéré sachant que le surnageant peut être conservé à -20°C jusqu'au moment d'usage. Puis on incube à 70°C pendant 20 min.
- Après incubation, 0.3ml du mélange est additionné par 0.5ml de créatine à 0.5% (p/v) et 0.5 ml du réactif α -naphtol à 5% dans la solution NaOH 2.5M.
- Laisser incuber 1h à la température ambiante.
- Après centrifugation à 10000tr/min pendant 15 s.
- L'absorption de la coloration développée est mesurée dans un spectrophotomètre à 420 nm (Metlef, 2008). La concentration en diacétyle est déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage en utilisant le diacétyle pure dans l'intervalle de 0 à 3 ppm de concentration (Westerfeld, 1945).

Les résultats sont représentés en traçant la courbe :

$$\text{Diacétyle produit (ppm)} = f(\text{temps(h)}).$$

Remarque : Le dosage a été effectué simultanément avec les études précédentes.

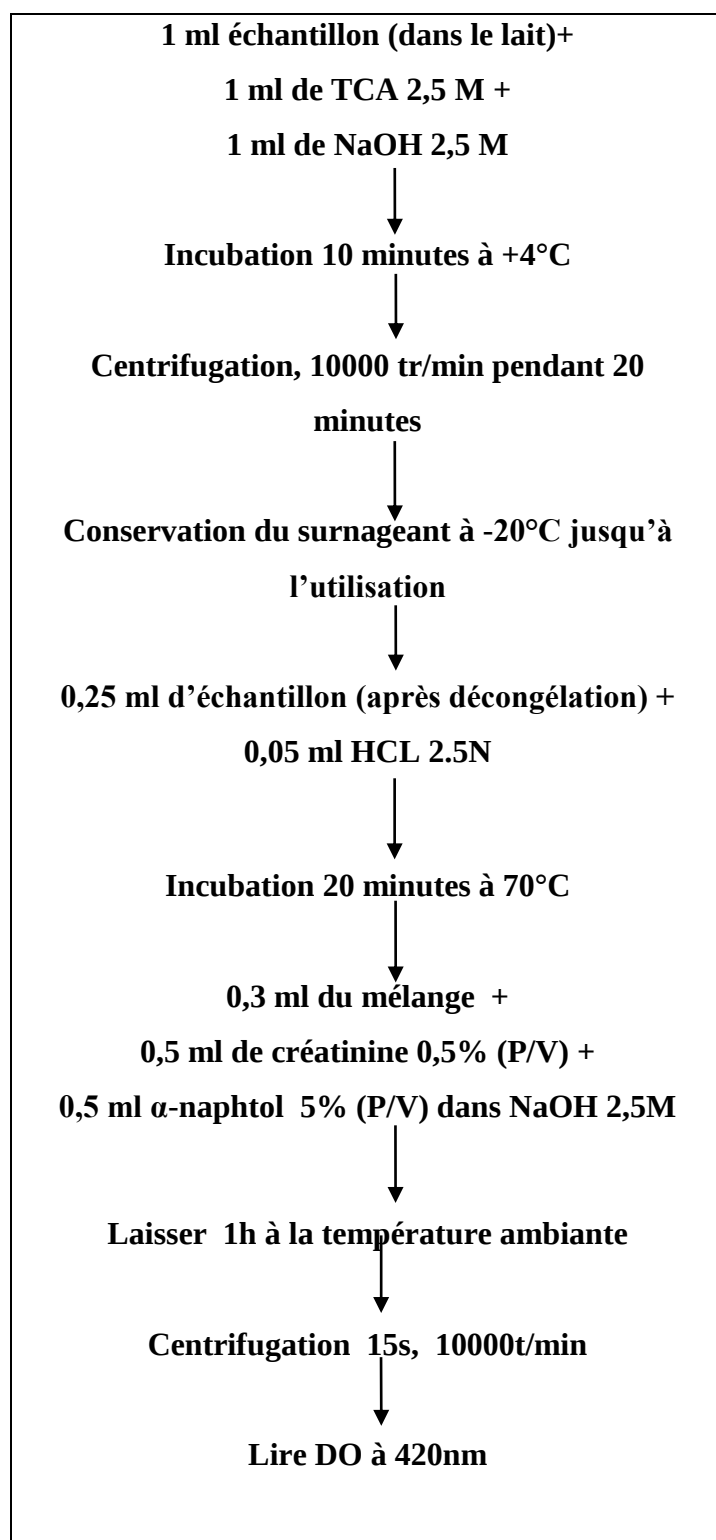


Figure 9: protocole du dosage de la somme du diacétyl-acétoïne



CHAPITRE III

Résultats et interprétations

CHAPITRE III : Résultats et interprétations

1. QUALITE HYGIENIQUE

1.1. Test réductase :

La plupart des bactéries en se multipliant dans le lait sont capables, grâce à l'action de leur réductase, d'abaisser le potentiel d'oxydo-réduction jusqu'à la décoloration d'un indicateur rédox. On utilise généralement le bleu de méthylène dont la forme réduite est incolore. Cette méthode d'estimation est approximative. En effet, l'activité réductrice des cellules microbiennes dépend non seulement de leur nombre, mais aussi des espèces présentes et de leur état physiologique (les streptocoques de mammites ne décolorent pas le bleu de méthylène). De plus, le colorant peut être réduit par les cellules somatiques de l'animal qui peuvent se trouver dans le lait (Guiraud, 1998).

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats du test de la réductase.

Les échantillons	Temps de décoloration au bleu de méthylène
Ech1	4h35min
Ech2	4hmin
Ech3	5h15min
Ech4	5h30min
Ech5	5h40min
Ech6	4h45min
Ech7	4h30min

h : heure ; **min** : minute

1.2. La flore microbienne de lait cru de chamelle :

1.2.1. La flore mésophile aérobie totale :

Le tableau 10 représente les résultats du dénombrement de la FTAM dans les différents échantillons de lait cru de chamelle analysés. Dont le nombre en flore totale n'a pas dépassé les 10^4 . Nous révélons un exemple de dénombrement sur milieu solide (PCA) dans la figure 10.

Tableau 12. Dénombrement de la FTAM dans les différents échantillons de lait cru de chamelle analysés.

Ech	Ech1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5	Ech6	Ech7
Moyenne (germes /ml)	3.77×10^4	5.3×10^4	9.8×10^3	9.4×10^3	2.3×10^3	3.4×10^4	2.4×10^4

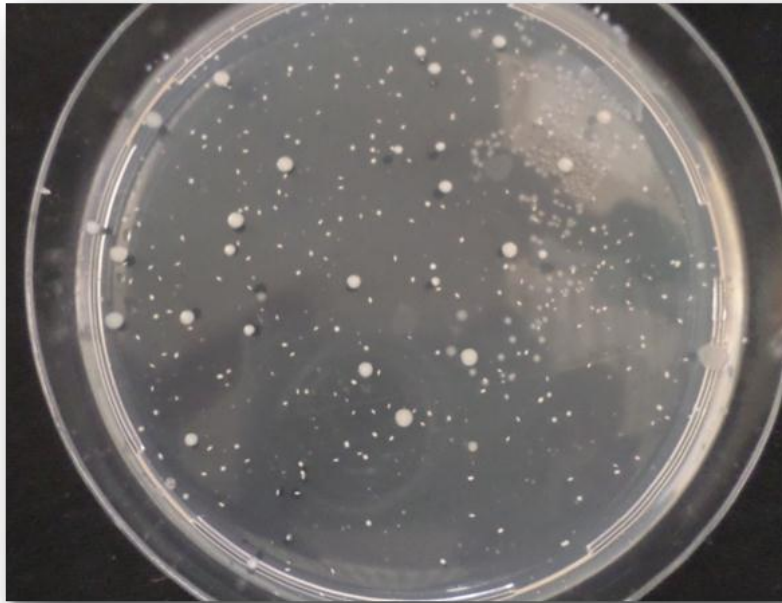


Figure 10 : colonies développées issues du lait de chamelle ensemencé sur milieu PCA.

1.2.2. Les entérobactéries :

Le tableau 11 ci-dessous, montre les résultats du dénombrement des entérobactéries dans les échantillons de lait camelin.

Tableau 13 : Dénombrement des entérobactéries dans les sept échantillons

Echantillons	Ech1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5	Ech6	Ech7
UFC/ml	6×10^1	11×10^2	Abs	Abs	Abs	Abs	8×10^1

Abs : Absence

1.2.3. Les coliformes :

a. Coliformes totaux (30°C) :

Les échantillons du lait analysés présentent une charge en coliformes avec une valeur minimale de 0.3×10^2 UFC/ml, en atteignant les 2.5×10^2 UFC/ml (tableau 14).

La réglementation algérienne ne définit pas une norme pour cette flore. Pour cela, nous essayerons de comparer nos résultats à d'autres études similaires. Tous les échantillons présentent une contamination en ces germes.

b. Coliformes fécaux (44°C)

Aucun résultat positif n'a été enregistré pour le dénombrement des coliformes thermotolérants.

La figure 11 montre les résultats du dénombrement des coliformes sur le milieu BLBVB.

Tableau 14. Résultats de dénombrement des coliformes pour les sept échantillons collectés.

	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7
10^{-2}	2	3	1	1	0	1	1
10^{-3}	0	0	1	0	0	2	2
10^{-4}	1	0	0	0	1	0	1
NPP	1.4	2.5	0.7	0.4	0.3	1.1	1.5
Ufc/ml	1.4×10^2	2.5×10^2	0.7×10^2	0.4×10^2	0.3×10^2	1.1×10^2	1.5×10^2

Ufc : unité formant colonie **NPP** : nombre plus probable.

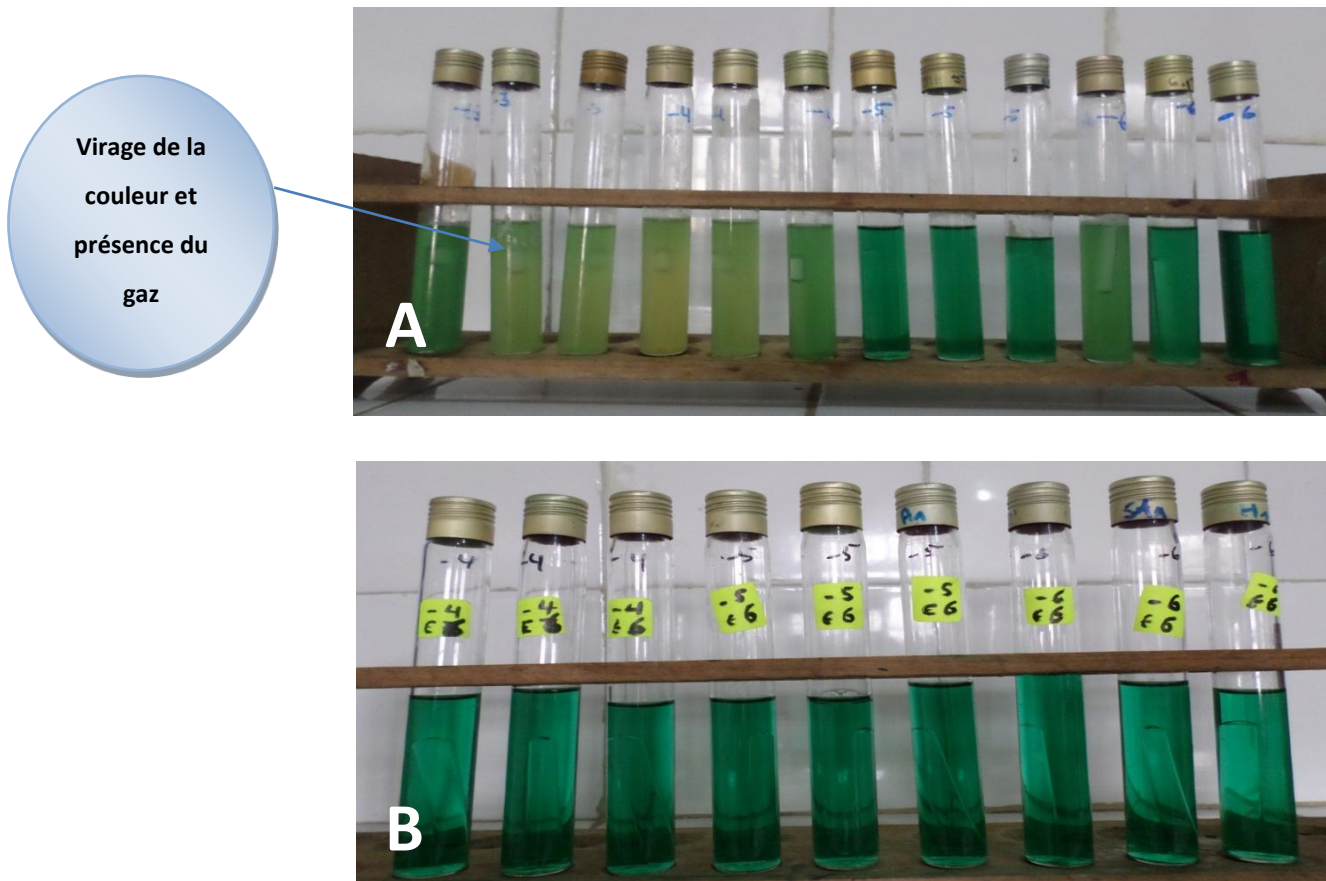


Figure 11 : Lecture des résultats des coliformes totaux (A) et les coliformes fécaux (B)

*

1.2.4. Les streptocoques fécaux :

Pour les streptocoques fécaux, la norme algérienne exige l'absence du germe dans 0.1 ml de lait cru (Aggad *et al.*, 2009).

Ces germes sont absents dans la totalité d'échantillons sauf pour le 2ème échantillon qui a enregistré un taux (3×10^2 UFC/ml) supérieur à celui défini par la norme Algérienne.

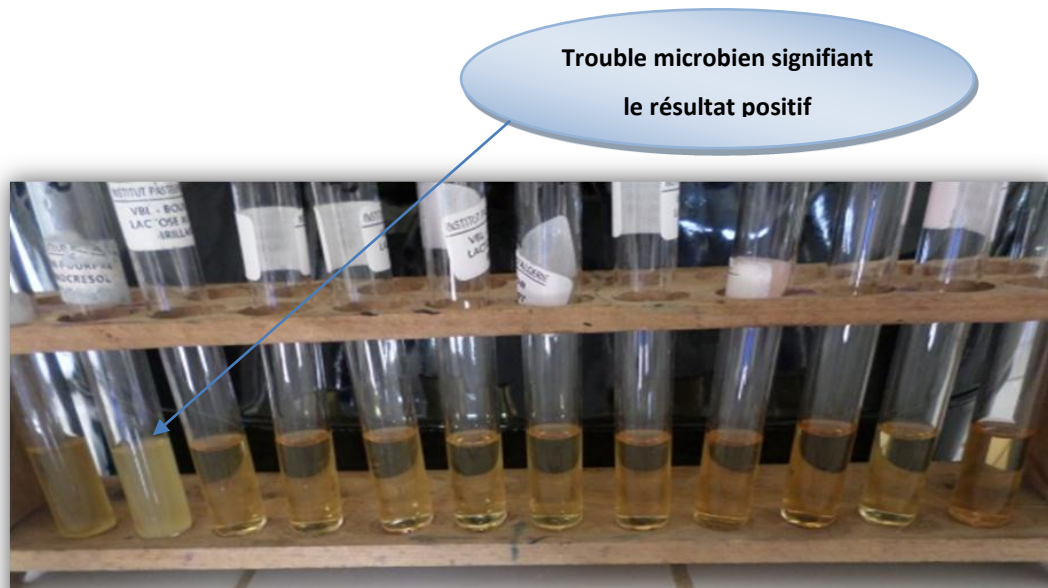


Figure 12 : La lecture des résultats des streptocoques fécaux sur le milieu Rothe.

1.2.5. Germes pathogènes :

Nous indiquons l'absence des germes présumés pathogènes recherchés (Salmonelles, les clostridiums anaérobies sulfito-réducteurs et les staphylocoques dorés)

Les figures 13, 14 et 15 montrent les résultats négatifs exposés dans les photos prises.

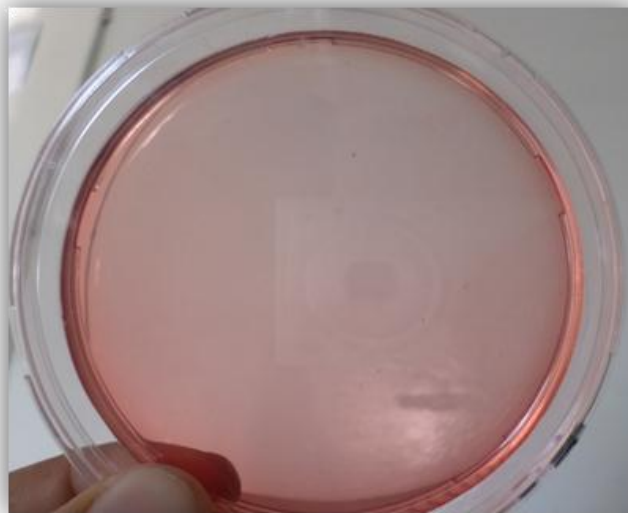


Figure 13 : Résultat négatif de staphylocoques sur le milieu Chapman.



Figure 14 : Absence des clostridiiums sulfito-réducteurs sur le milieu VF.

1.2.6. La flore lactique :

Le dénombrement de la flore lactique sur MRS, dénonce des résultats variant entre 2.6×10^5 UFC/ml et 4.8×10^5 UFC/ml pour les bactéries lactiques mésophiles. En outre, pour les bactéries thermophiles : les résultats étaient de 3.3×10^3 UFC/ml à 6.5×10^3 UFC/ml. Et pour les lactobacilles les résultats montrent une valeur maximale de 2.6×10^4 UFC/ml.

Les valeurs en UFC/ml des différents échantillons sont illustrées dans le tableau 5 suivant. Et la Figure 16 révèle des colonies de bactéries lactiques ayant poussées sur le MRS.



Figure 15 : Dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS.

Tableau 15 : Résultats de dénombrement de la flore lactique chez les différents échantillons du lait camelin.

Echantillons	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6	Ech 7
UFC/ml	6.3×10^9	11.5×10^8	7.1×10^7	6.7×10^8	4.6×10^9	7.8×10^8	5.8×10^9

2. CHOIX DE L'AGENT SELECTIF :

Selon les rapports précédents sur le comportement des bactéries Lactiques vers les antibiotiques, l'agent sélectif a été choisi. A titre informatif, les souches de *Lactococcus* résistent au triméthoprim (Giraud *et al.*, 1997) et à la rifampicine (Giraud *et al.*, 1997, De Fabrizio *et al.*, 1994 : Herreros *et al.*., Ammor *et al.*, 2007) et selon les profils de l'antibiogramme du genre *Lactococcus* documentés et rapportés dans la littérature.

Une méthode de comptage sélectif de trois espèces *Lactobacillus plantarum* A6, *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus lactis* basée sur l'utilisation de spécifique des sucre comme source de Carbone et la résistance aux antibiotiques, cette résistance aux antibiotiques se traduit par un virage de couleur du milieu de culture liquide l'utilisation du sucre spécifique (éventuellement le développement des bactéries). Les résultats montrent que l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum* A6 résistent plus en mois au triméthoprim et aussi a la rifampicine, aucunes de ces deux espèces ne s'est montrée résistante à l'action des deux antibiotiques associés.

En revanche, une bonne croissance de *Lactococcus lactis* dans le milieu qui contient les deux antibiotiques séparés et associés, ce qui signifie que ce genre résiste au triméthoprim et à la rifampicine ainsi qu'à l'association de ces derniers (Giraud, 1997). Quarante huit pour cent (48%) de résistance à la rifampicine chez des lactocoques a été enregistrée par Ziane (2008). Ainsi, d'autres auteurs (Swenson *et al.*, 1990 ; Dalache *et al.*, 2003 ; D'Aimmo *et al.*, 2007 ; Ziane, 2008) ont constaté la sensibilité de la quasi-totalité de lactobacilles étudiés à la rifampicine et au triméthoprim . Le genre *Leuconostoc* s'est montré sensible à la rifampicine (Zarour *et al.*, 2011) où plusieurs auteurs ont montré la sensibilité des pédiocoques à la rifampicine (Swenson *et al.*, 1990 ; Ammor *et al.*, 2007 ;

Ziane, 2008). Des résultats ont montré que *Streptococcus* est sensible à la rifampicine (D'Aimmo *et al.*, 2007 ; Ziane, 2008).

Les entérocoques sont généralement sensibles *in vitro* au triméthoprim (Crider et Colby., 1985); toutefois, le rôle de triméthoprim comme une option thérapeutique pour les infections à entérocoques est controversée (Hamilton, 1988 ; Murray, 1989) et a été largement rejetée sur la base des rapports des échecs cliniques (Goodhard, 1984). Le triméthoprim inhibe l'enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) qui catalyse la réduction de dihydrofolate à tétrahydrofolate dans des cellules procaryotes et eucaryotes (Hitchins, 1973). Chez les souches des entérocoques une résistance à la rifampicine a été enregistrée par Ziane (2008). Et Valenzuela *et al.* (2009).

Vu les résultats de tous ces auteurs, nous avons préféré le triméthoprim et la rifampicine comme agents sélectionnant que l'on pourrait ajouter au milieu M17 et Elliker, afin qu'il soit adéquat permettant l'isolement et le développement des espèces du genre *Lactococcus* représentant une importance très réputée et très recherchée dans l'industrie agroalimentaire.

3. CHOIX DE MILIEU DE CULTURE :

Les milieux Elliker et M17 sont généralement utilisés pour faire pousser les lactocoques au laboratoire. Le premier sert à isoler et à énumérer les lactocoques, tandis que le deuxième sert plutôt à faire croître ces derniers (Elliker *et al.*, 1956 ; Terzaghi et Sandine, 1975).

Après avoir retenu le milieu de culture adéquat, la concentration finale 0.5mg/ml de Triméthoprim et 0,1 mg/ml, 0,2mg/ml et 0,3mg /ml de Rifampicine ont été choisis pour poursuivre notre étude en raison de l'obtention des colonies éparpillées et observables présentant des caractéristiques typiques des bactéries lactiques.

3.1. Dénombrement de la flore lactique totale :

Tableau 16. Sans addition des antibiotiques.

Milieu d'isolement	[C] d'antibiotiques	Flore totale lactique (UFC/ml)
M17	0	184.10 ⁷
ELLIKER	0	200.10 ⁷

Tableau 17. Avec l'addition du Triméthoprim.

Milieu d'isolement	[C] d'antibiotiques (mg/ml)	Flore totale lactique (UFC/ml)
M17	0.5	45.10 ⁶
ELLIKER	0.5	38.10 ⁶

Tableau 18. L'addition de la rifampicine à différentes concentrations.

Milieu d'isolement	[C] d'antibiotique	Flore totale lactique (UFC/ml)
M17	0,1	120.10 ⁶
Elliker	0,1	98.10 ⁶
M17	0,2	112.0 ⁶
Elliker	0,2	93.10 ⁶
M17	0,3	72.10 ⁶
Elliker	0,3	64.10 ⁶

Tableau 19. L'addition de Triméthoprime et la rifampicine.

Milieu d'isolement	[C] d'antibiotiques (mg/ml)			Flore totale
(Triméthoprime + rifampicine)	0.5	+	0.3	0
M17				
Triméthoprime	0.5	+	0.3	0
+Rifampicine)				

Les tableaux ci-dessus présentent le nombre de la flore lactique totale dénombrée dans le lait cru de chamelle après incubation à 30°C pendant 24h le nombre de colonie ainsi obtenu est 184.10^7 UFC/ml sur M17 et sur Elliker 200.10^7 UFC/ml l'étude de Louembe *et al.*, 1996 révèle que la microflore dominante du poto-poto était constituée de bactéries lactiques de $1,8.10^{10}$ UFC/ml (Louembe *et al.*, 1996).

Le même type de résultat est observé sur les laits crus de vaches produites en Algérie (Bekhouche *et al.*, 2005 et Saïdi, 1998)

Un taux accès élevé de la flore lactique totale qui a été diminué en M17+triméthoprime et Elliker+triméthoprime (0,5mg/ml) le nombre de colonies formées est de 45.10^6 UFC/ml et 38.10^6 UFC/ml respectivement. Le milieu Elliker a permis une réduction de la flore totale à 98% suivie par le milieu M17 avec 97%, cette diminution s'exprime d'une part par l'effet inhibiteur exercé par le triméthoprime qui a été plus efficace sur Elliker que le M17 et d'autre part la sensibilité des espèces constituant la microflore lactique total du lait cru de chamelle.

Ces résultats indiquent que CMI (concentration minimale inhibitrice) dans les milieux pourrait être plus de 0.5 mg/ml et moins de 1,5 mg/ml de Triméthoprime.

Et concernant la rifampicine, les trois concentrations différentes nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

Dans Le second antibiotique la rifampicine testé avec différentes concentrations 0,1mg/ml, 0,2 mg/ml et 0,3mg/ml, la flore lactique totale devient en milieu Elliker 98.10^6 UFC/ml, 93.10^6 UFC/ml et 64.10^6 UFC/ml respectivement.

La réduction était de 93% sur M17 et 97% sur Elliker ce qui explique encore une fois l'efficacité sélective d'Elliker par rapport au M17 additionné d'un autre

antibiotique, la Rifampicine. Cet antibiotique a un effet sur la flore totale lactique mais moins efficace comparativement au triméthoprim.

On remarque que les deux milieux Rifampicine (0.1) Elliker/M17 et Rifampicine (0.2) Elliker/M17 ont donné le même résultat, La concentration testée de Rifampicine 0.3mg/ml donne un résultat plus efficace que les deux concentrations précédentes. Dont la réduction de la flore lactique totale (FLT) était 96% sur M17 et 97% sur Elliker par rapport à la flore totale lactique dénombrée sur les milieux sans antibiotiques.

La CMI de la rifampicine pour la flore totale lactique est plus de 0.1mg /ml et moins de 2mg/ml pour la rifampicine.

Une autre remarque : L'association des deux antibiotiques n'a donné aucune croissance. Ces résultats signifie et confirme l'effet exercé par la synergie des antibiotiques illustré (Zoumahou, 2005 ; Euzeby, 2007).

4. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES

4.1. Aspect macroscopique :

Il est à noter que les concentrations des antibiotiques testées avant il n'y a pas eu une croissance.

L'observation macroscopique des cultures sur les géloses, révèle la présence des colonies de petite taille, blanches, ou crémeuses, lenticulaires ou circulaires, brillantes ,ne présentant pas un aspect filamenteux, parfois, les bords de certaines colonies sont plus claires et éblouissantes (Figure 16).

Seules les bactéries Gram positive et catalase négatif qui se présentent sous forme en coques isolées, en paires ou en chainettes sont retenues.

Les colonies ne présentaient pas une grande hétérogénéité morphologique, sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

L'aspect des colonies visqueuses signe à la production du dextrane sur Elliker lactosé utilisé pour la purification des bactéries lactiques.

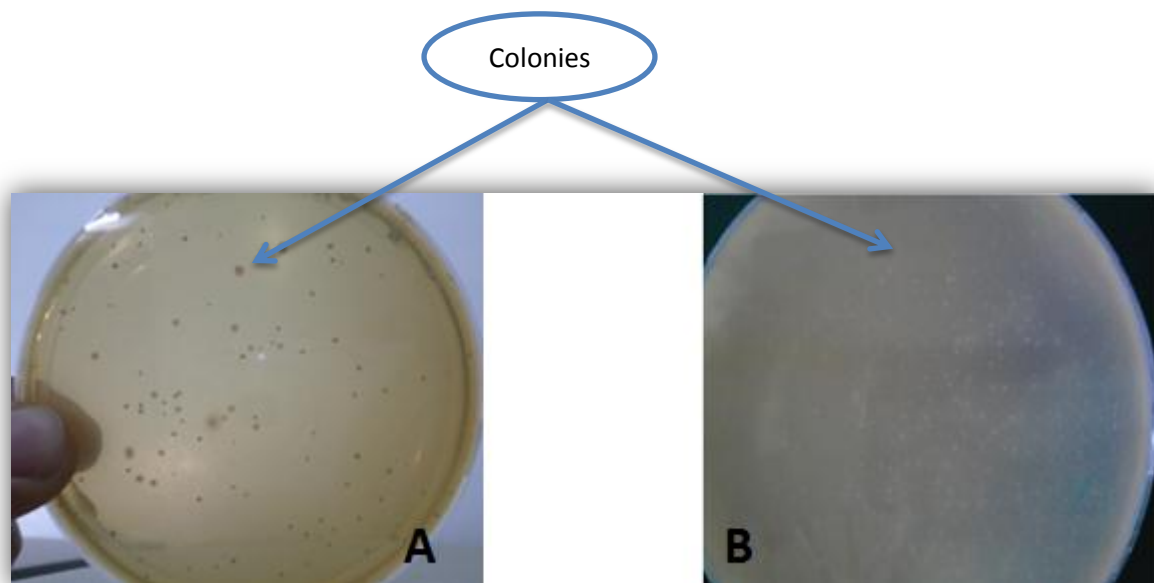


Figure 16. Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactique sur Elliker +Rifampicine (0,1mg /ml) « photo A » et sur Elliker +Triithoprème (0,5mg/ml) « photo B ».



Figure 17. Purification des souches de *Lactococcus* sp sur milieu Elliker.

4.2. Aspect microscopique :

L'examen microscopique fournit des renseignements concernant la morphologie des bactéries (cocci, bacilles, spirales, à bord parallèles ou non à extrémités arrondies ou effilées...).ainsi que leur taille. La coloration de Gram de les classer en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, ainsi que d'observé des arrangements particuliers (diplocoques, palissades, chainettes, tétrades....).

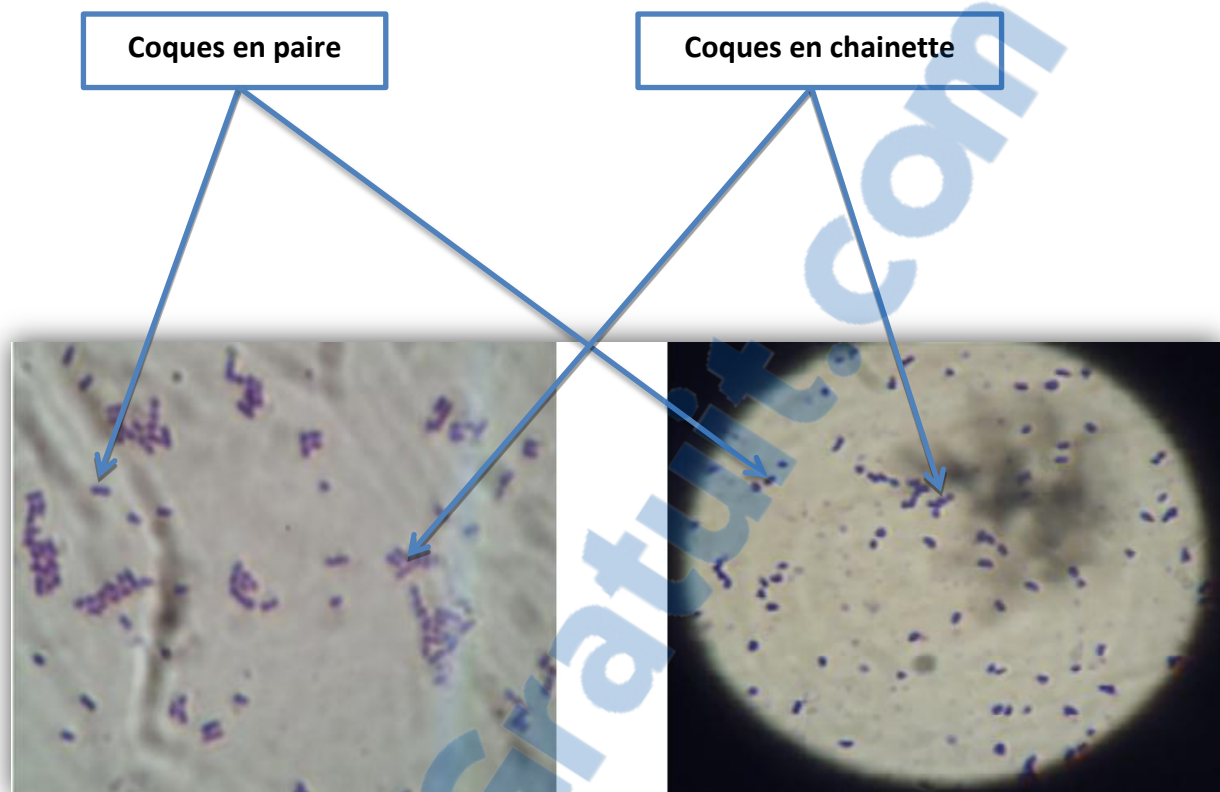


Figure 18. Aspect microscopique de *Lactococcus* sp (Gr : X1000)

Dans notre recherche, l'observation microscopique a révélé une forme de cellules majoritaire qui est la forme cocci (68,7%). Ces coques sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues ou bien isolées. Une forme de bacilles dispersés (31, 3%).

Zadi-karam *et al* ., 2005 ont identifié les bactéries lactiques du lait de chamelle et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles où *Lactococcus* sp. A présenté un pourcentage de 34,6%, suivi de *Lactobacillus* (18,5%) et de *Leuconostoc* (12.3%).

Cette observation de bacilles montre qu'il y a des bacilles qui résistent aux antibiotiques utilisés. Cela concorde avec le résultat de Giraud (1997) qui a eu une croissance des lactobacilles dans le milieu liquide + Rifampicine et + triméthoprime respectivement. Si l'étude de la morphologie des cellules n'est pas suffisante pour caractériser les souches, elle apporte néanmoins des renseignements sur la pureté des souches. L'observation microscopique nous a permis de prévoir le but de notre recherche.

Après purification de ces colonies, nous avons procédé à leur identification.

5. IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES :

A partir de sept échantillons du lait cru de chamelle, nous avons isolé 125 isolats ayant un profil homofermentaire à Gram positif, à catalase négative à partir des quels 80 isolats cocci ont été retenus, parmi cette collection des coques on se basant sur les résultats du test de bleu de Sherman, seulement 40 isolats représentatifs de la flore dominante ont été identifiés de manière complète par les méthodes phénotypiques.

Au total, 40 isolats ont été identifiés ont montré une capacité de croître à 10°C et à 40°C mais pas à 45°C présentant une hémolyse y, quelques isolats se développent sur lait de Sherman 0.1% et 0.3% et ainsi que dans un bouillon hypersalé à 4%. Ne se développent pas à pH 9,6 ne poussent pas à 6,5% NaCl et elles ne survivent pas après un traitement de thermorésistance, on les a attachés au genre *Lactococcus*.

Par rapport au test de l'ADH, la production d'acétoïne, hydrolyse de l'esculine 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 Mc Cance, 1976).

Les isolats se sont montrés tous homofermentaires ne produisant pas le CO₂ à partir du glucose cela signifie que notre milieu testé a un effet sur les micro-organismes hétérofermentaire signalons *Leuconostoc* sp.

Absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire homofermentaire.

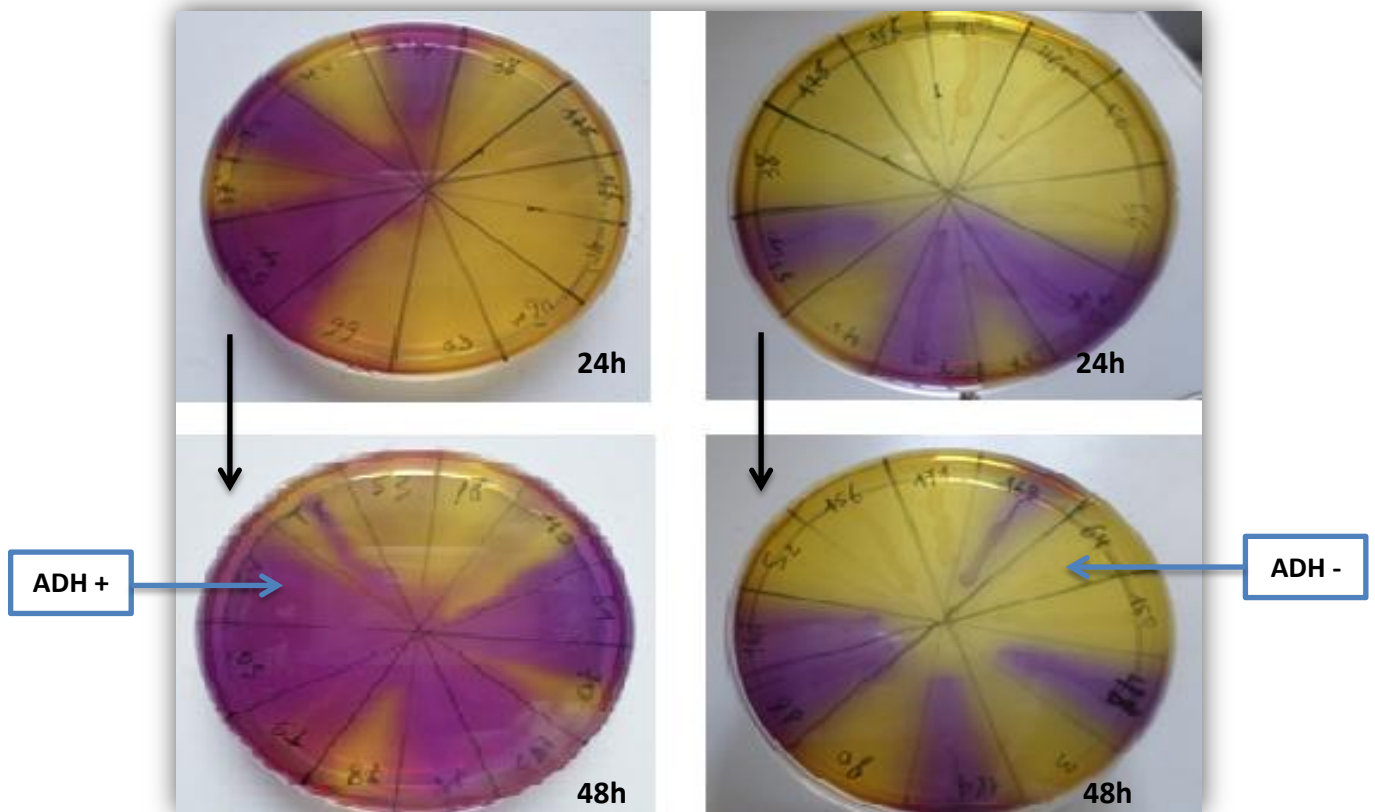


Figure 19. La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).

▪ Type fermentaire :



Figure 20. Résultat de type fermentaire des isolats.



▪ Lait de Sherman :

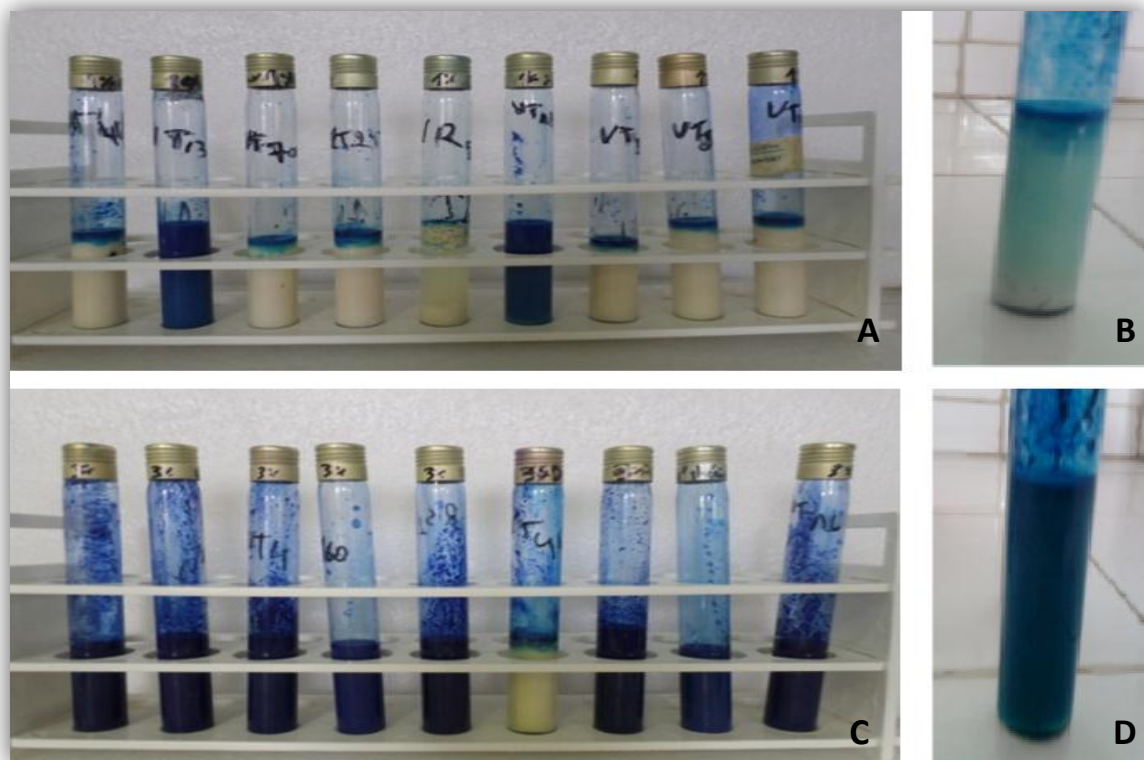


Figure 21. Résultat du test de lait de Sherman

A et B : 0,1 % de Blue de méthylène ; **C et D :** 0.3 % de bleu de méthylène

Après l'incubation, quelque isolat pousse sur le lait de Sherman 1% et 3% de bleu de méthylène et aucune croissance n'a été constatée sur le lait à 1% et 3% de bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène est d'une couleur bleue en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit, ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ce sont des micro-aérophiles, il ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilise tous l'oxygène de bleu de méthylène (Larpent *et al* 1990), l'obtention d'un calai blanc s'explique par l'augmentation de la charge bactérienne.

- L'utilisation de citrate :

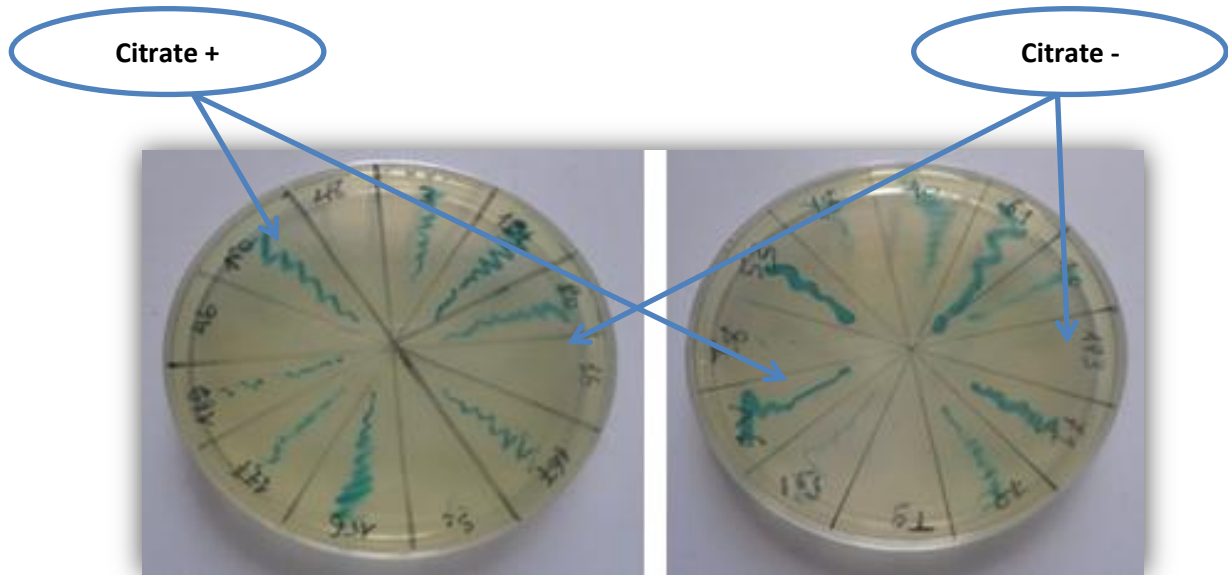


Figure 22. Test de réduction de citrate sur milieu KMK.



Figure 23. Test de réduction de citrate sur milieu citrate de Simmons.

T : témoin

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

- La croissance en conditions hostiles :

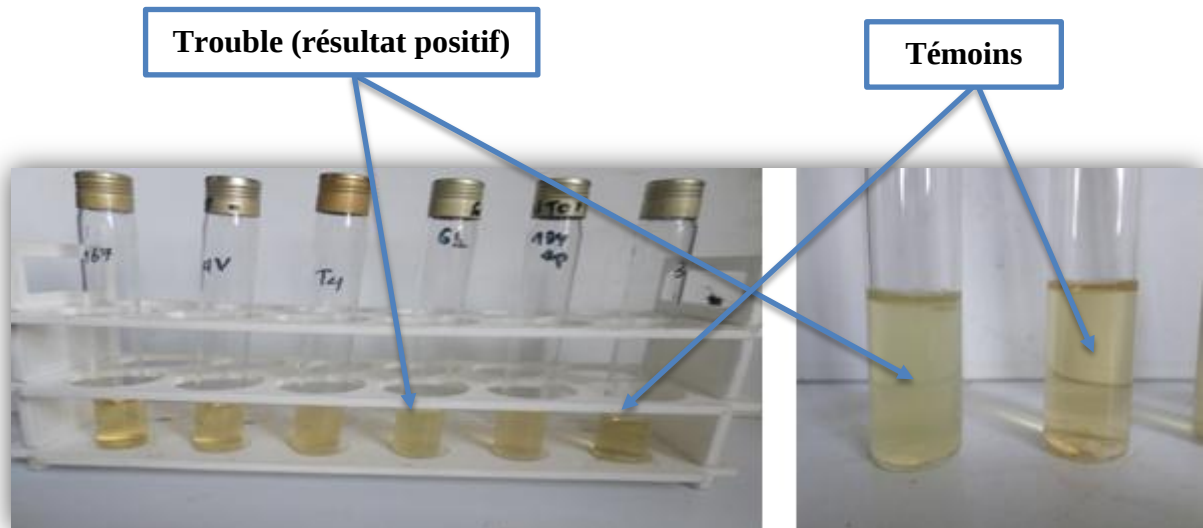


Figure 24. Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (4% NaCl).

Pour le test de résistance sur milieu hypersalé de 6.5% de NaCl, Aucune croissance des isolats purifiés n'a été constatée.

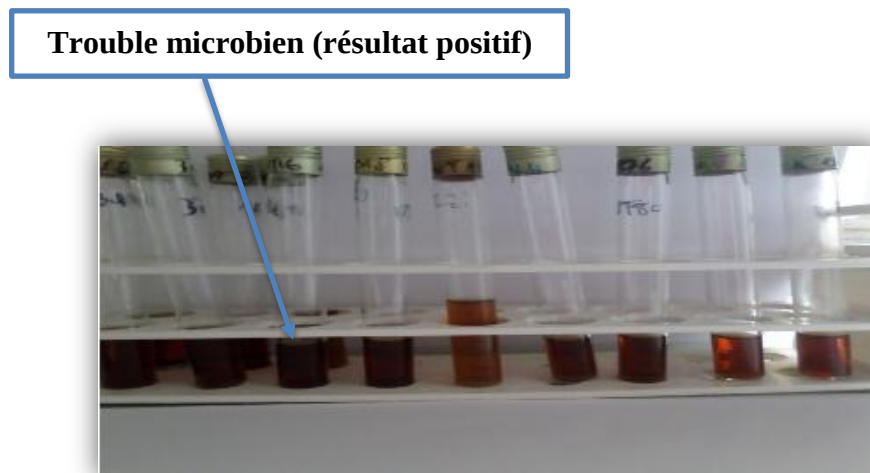


Figure 25. Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.



Figure 26. Résultat de La croissance des isolats sur milieu Elliker pH 4.

▪ **Test de la thermorésistance :**

Absence de trouble pour tous les isolats testés, tous les isolats n'ont pas réussi à survivre après ce traitement de thermorésistance ce teste on a permet de sélectionner les lactocoques en éliminant les streptocoques et les entérocoques.

La croissance est mise en évidence par l'apparition d'un trouble dans le milieu liquide.

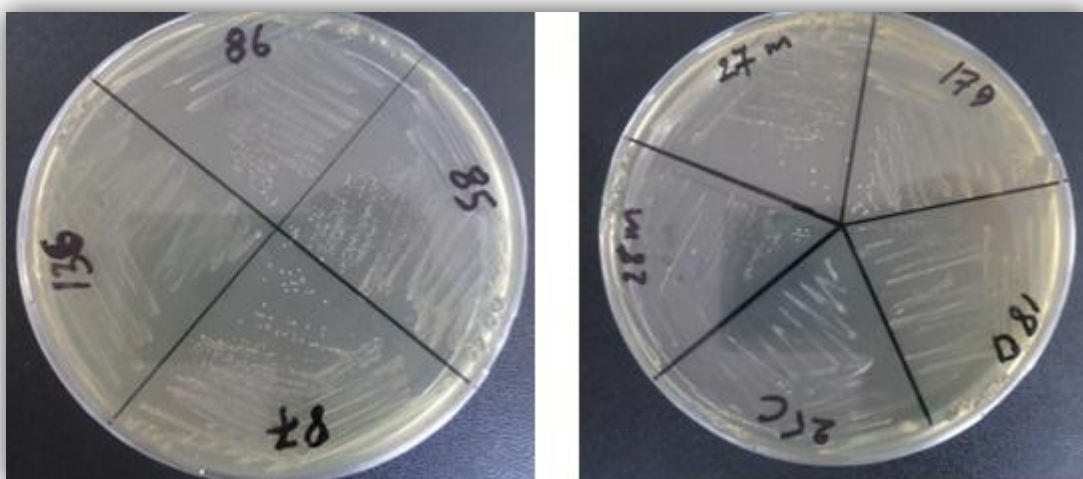


Figure 27. Résultat du test de croissance à 10°C

- Dégradation de l'esculine :

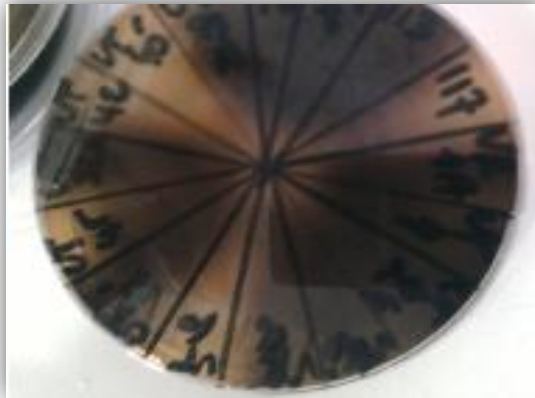


Figure 28. Résultat de la dégradation de l'esculine sur BEA.

- Teste de production de l'acétoïne :

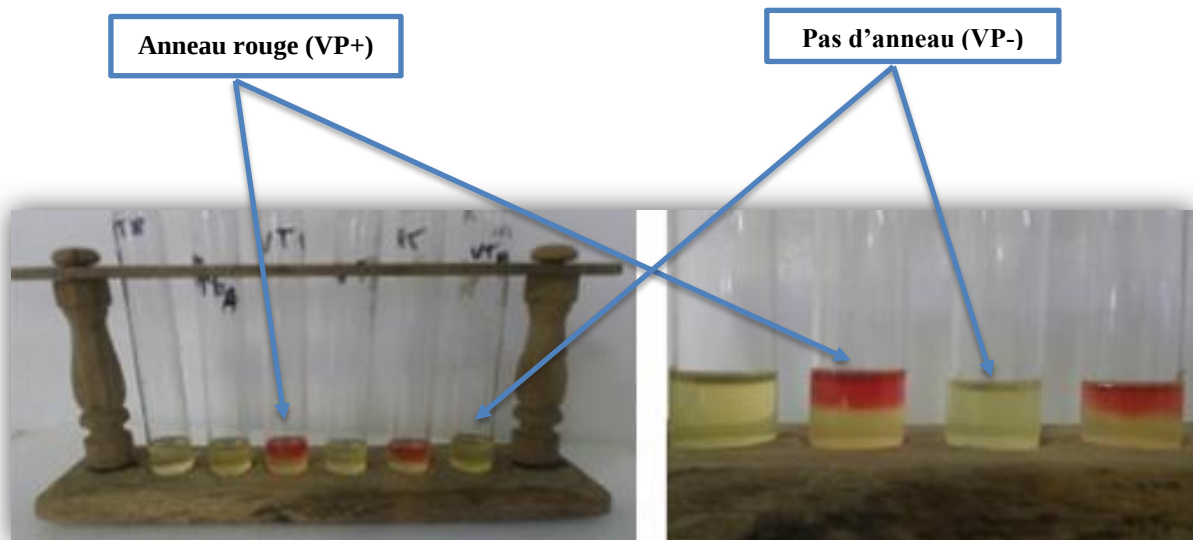


Figure 29. Test de la production d'acétoïne.

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

De nombreux auteurs ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne (Monnet *et al.*, 2008). D'après Phalip *et al.* (1994), l'acétoïne est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique.

▪ **Profil fermentaire des sucres :**

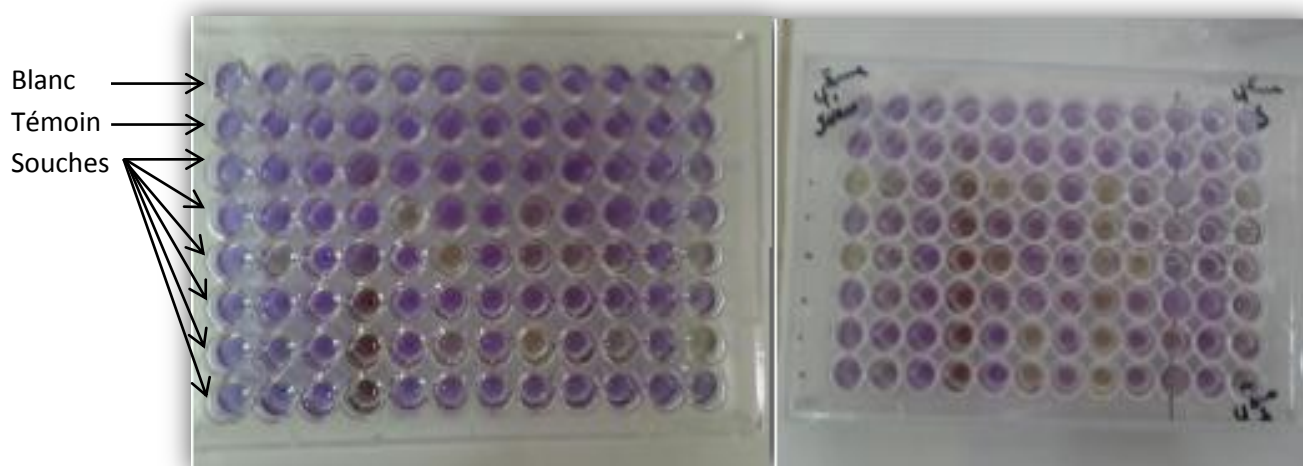


Figure 30. Résultats du test de sucre des isolats.

▪ **La galerie API Strep :**



Figure 31. La galerie biochimique de la souche.

Tableau 20. Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre présumées *Lactococcus* isolées du lait cru de chamelle.

Isolats	A D H	Bleu de méthylène		ACT	4% NaCl	6.5% NaCl	forme	CTR	45C°	PH4	PH9 .6	E S C	HymoLyse	10C°	40C°	R E S
		0.1%	0.3%													
MT82	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	-	Y	+	+	-
MT46	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT21	-	+	+	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT63	+	+	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT6	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	-	-
MT36	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT94	-	-	-	+	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT13	-	-	-	+	+	-	Coque	+	-	+	-	-	Y	+	+	-
MT16	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	+	+	Y	+	+	-
MT0	+	+	-	-	-	-	Coque	-	-	+	-	-	Y	+	-	-
MT1	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MR32	+	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	+	+	Y	+	+	-
MT1	-	-	-	-	-	-	Coque	-	-	+	+	-	Y	+	+	-
MT44	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT2	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MR10	+	-	-	-	+	-	Coque	+	-	-	-	-	Y	+	+	-
MT10	+	-	+	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT78	-	-	-	+	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT44'	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MR1	+	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	-	Y	+	+	-
MT1	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT63'	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT32	-	+	+	-	+	-	Coque	-	-	+	+	+	Y	+	+	-
MT12	-	+	+	+	+	-	Coque	+	-	+	-	-	Y	+	+	-
MT16	-	-	-	-	+	-	Coque	N	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT26	-	+	-	-	-	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT48	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT28	-	-	-	+	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT90	+	+	-	-	+	+	Coque	+	-	-	-	-	Y	+	+	-
MR32	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT70	-	-	-	-	-	-	Coque	-	-	-	-	+	Y	+	+	-
MT45	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	+	-	+	Y	+	+	-
MT1	-	-	-	-	+	-	Coque	-	-	N	-	+	Y	+	+	-

MT56	-	+	-	+	+	-	Coque	-	-	+	-	+	Y	+	+	-
MR17	+	+	-	+	+	-	Coque	+	-	-	-	-	Y	+	+	-
MR18	+	-	+	+	+	-	Coque	-	-	-	-	-	Y	+	+	-
MR13	-	-	+	-	+	-	Coque	+	-	-	-	+	Y	+	+	-
MR07	-	-	-	-	+	-	Coque	+	-	-	-	+	Y	+	+	-
MR24	+	-	-	-	-	-	Coque	-	-	-	-	-	Y	+	-	-
MR25	+	+	-	-	+	-	Coque	N	-	+	-	+	Y	+	+	-
								D								

ADH : production de l'arginine dihydrolase. ESC : hydrolyse de l'esculine. ACT : production d'acétone. CTR : dégradation de citrate. RES : thermorésistance à 60,5 °C pendant 30 min. GAZ : production de gaz à partir du glucose. % : concentration de NaCl.

Tableau 21. Profile fermentaires des isolats du genre présumé *Lactococcus* sp.

Isolats	Sucres										
	Mannitol	raffinose	Amidon	Lactose	D-xylose	Sorbitol	Arabinose	Maltose	fructose	Rhamnose	Saccharose
MR07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR13	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
R24	+	-	-	-	±	-	+	+	-	+	+
MT32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MT120	±	±	-	+	+	-	+	+	+	-	±
MT82	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
MT63	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
MT56	+	±	-	+	+	±	+	+	±	±	+
MT1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MT10	-	-	-	+	-	-	+	-	±	-	-
MT45	-	±	-	-	+	-	+	+	+	-	+
MT214	-	-	-	-	+	-	-	±	+	-	-
MT44'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MT2	+	-	-	±	+	-	+	+	+	-	+
MT46	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MT26	+	-	-	±	-	-	-	+	-	-	-
MT44	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	±
MT94	-	+		-	+	-	+	-	-	-	-
MT11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

La pré-identification de 40 isolats, est complétée par l'étude du profil fermentaire des sucres conformément aux données bibliographiques (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.* , 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Tableau 22. Profil fermentaire et biochimique des isolats par galerie API 20 Strep.

Isolats	MR18		MR17		MT13		MT28		MT94	
Sucres										
Heures	24H	48H	24H	48H	24H	48H	24H	48H	24H	48H
VP		+		+		+	+			+
HIP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ESC	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PYRA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GAL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GUR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GAL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RIB	+	+	-	-	-	- +	-	-	-	-
ARA	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
MAN	±	+	+	+	-	+	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	+	+	-	±	+	+
AMD	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 23 : la distribution des espèces appartenant au genre *Lactococcus* selon l'antibiotique utilisé.

Souches croissantes en triméthoprine (0,5mg/ml)	Souches croissantes en Rifampicine (0, 3mg/ml)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> : <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Lactococcus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactisbiovar.</i> <i>diacetylactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>

Tableau 24: la distribution des souches du genre *Lactococcus* selon l'antibiotique et les milieux de culture.

Les Antibiotiques	Triméthoprine (0,5mg/ml)		Rifampicine (0,3mg/ml)	
Les Milieux	M17	Elliker	M17	Elliker
Les souches		MT214, MT36		
		MT1, MT11		
		MT48, MT160		
		MT16, MT32		MR17
	MT82	MT82, MT12		MR18
	MT6	MT90, MT28		MR13
	MT78	MT36, MT78		MR24
		MT94, MT120		MR25M
	MT10	MT44', MT45	MR08	R32'
	MT70	MT44, MT26	MR32	MR07
	MT28	MT63', MT2		MR16
	MT13	MT46		

6. RESULTATS DES CINETIQUES :

6.1. Etude des cinétiques des souches : (MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) en culture pure :

Dans la plupart des procédés industriels de transformation du lait, les bactéries lactiques présentes dans le lait cru sont détruites lors de la pasteurisation. Elles doivent être réintroduites par des ferments composés de souches préalablement sélectionnées suivant des critères d'aptitudes technologiques et organoleptiques : acidification, production de composants de saveur et d'arôme, dégradation des protéines, dégradation des lipides, comportement en association avec d'autres espèces microbiennes, culture mixte des souches de même espèce (sous-espèce différent) . (Champagne *et al.*, 2000).

A. Pouvoir acidifiant :

Afin de sélectionner des souches lactiques intéressantes du point de vue technologique, l'étude du pouvoir acidifiant s'est avérée importante. Elle est évaluée par le suivi de l'acidité Dornic d'un lait écréméensemencé par une souche pure de *Lactococcus lactis* à 30°C pendant les intervalles du temps suivant : 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48 heures.

Les résultats de la production d'acide lactique et les valeurs du pH des souches (MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) étudiées pendant 48 h sur milieu lait écrémé, nous a permis d'avoir les représentations graphiques ci-dessous **Figure (30)**. Les valeurs trouvées montrent des variations plus ou moins importantes entre les différentes sous espèces elles varient entre 14 et 23°D à 0 h et restent presque inchangées après 3 h d'incubation ce qui s'explique par l'adaptation des souches aux conditions du milieu (phase de latence).

Après 6 h d'incubation, l'acidité commence à augmenter progressivement et varie de 21 à 45°D pour la souche MT45, 21 à 41°D pour la souche MR10, 26 à 40°D pour MT32, 20 à 46°D pour MT28, 19 à 43°D pour MT56, 20 à 49°D pour MR08 et 21 à 62°D pour MT63. Au-delà de 48 h d'incubation, les valeurs d'acidité Dornic augmentent fortement pour atteindre : 55°D pour MT45, 48°D pour MR10, 49°D pour MR32, 54°D pour MT28 et MT56, 53°D pour MR08, 78°D pour MT63.

Les sous espèces de *Diacetylactis* sont faiblement acidifiants et l'acidité Dornic reste inférieure à 50°D après 48 h d'incubation. (**Figure 30**).

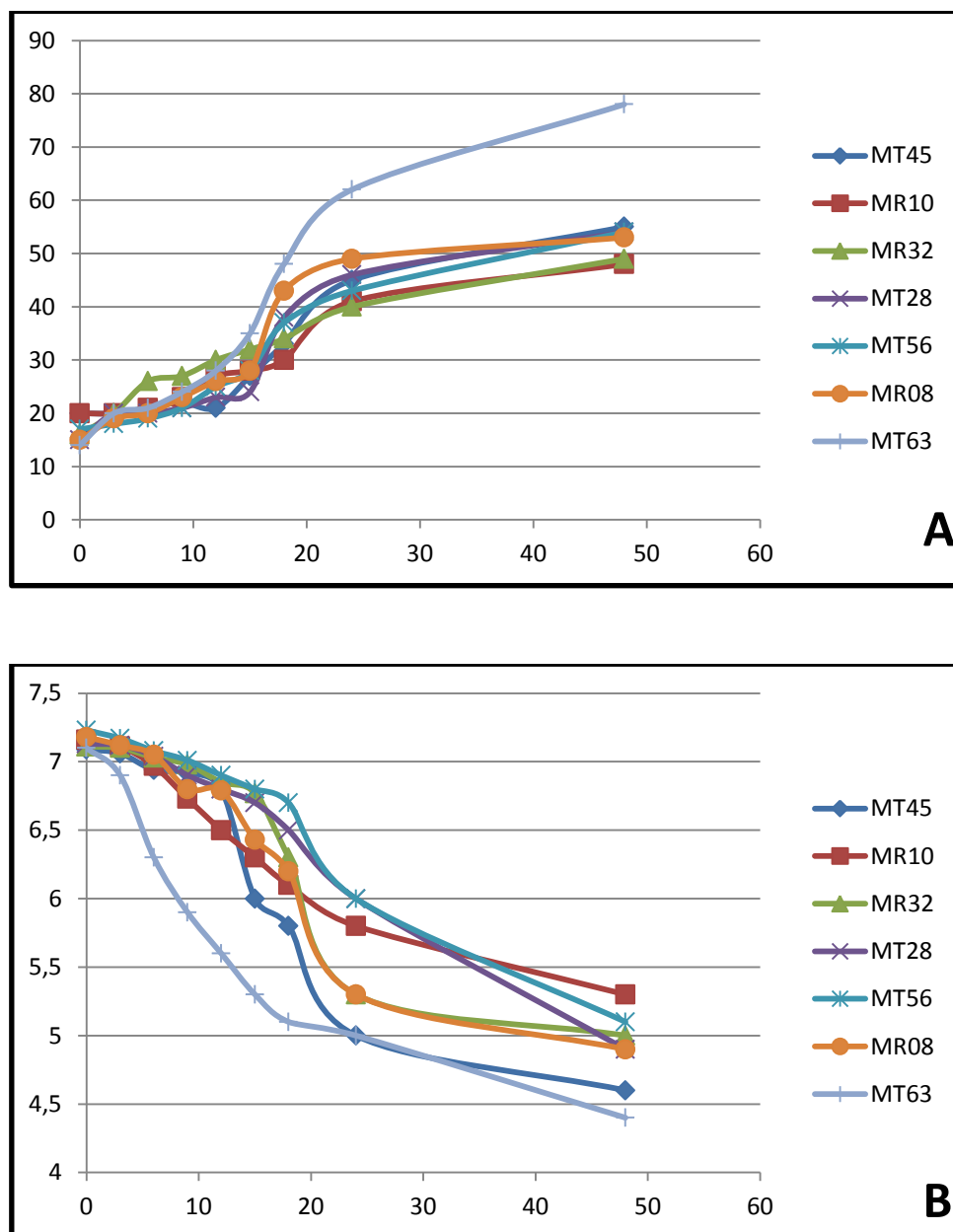


Figure 32. Les cinétiques d'acidifications, l'évolution de l'acidité titrable (A), l'évolution de pH (B), des souches ((MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) dans le lait écrémé.

B. Evolution de la biomasse :

La croissance bactérienne est suivie par dénombrement sur milieu solide Elliker lactosé.

Tableau 25: résultats des taux de croissance des souches étudiées.

Souche	$\mu \text{ h}^{-1}$	G
MT45	1,62	25 min
MR10	1,19	34 min
MR32	0,56	74 min
MT28	0,16	4h33min
MT56	2,79	14 min
MR08	2,79	14 min
MT63	2,82	14 min

G : temps de génération

$\mu \text{ h}^{-1}$: taux de croissance spécifique

L'évolution de la croissance des souches durant 48h de fermentation nous a permis de distinguer les différentes phases de croissance de ces bactéries, où on remarque que la phase de latence ne figure pas dans la courbe cela est due au fait que nos souches se sont adaptées rapidement au milieu dans laquelle elles sont cultivées, qui se reflète par une phase de latence trop courte, un caractère très recherché en industrie laitière permettent un meilleur rendement et une meilleure productivité.

Un taux de croissance de $2.82 \mu \text{ h}^{-1}$ est atteint par la souche MT63, et $2,79 \mu \text{ h}^{-1}$ pour MR08 et MT56.

Le calcul du temps de génération montre que ces souches se multiplient plus rapidement chaque 14min.

Alors que les autres MT45, MR10, MR32, MT28 ont marqué leurs croissances respectivement par des taux de croissances suivants : 1,62 ; 1,19 ; 0,56 ; 0,16 $\mu \text{ h}^{-1}$.

Des valeurs de taux de croissance beaucoup moindres ($\mu < 0,07 \text{ h}^{-1}$) sont obtenues après 24h de croissance indiquant de la phase stationnaire (phase de décélération).

La souche de *Lactococcus* MT28 a atteint une valeur de taux de croissance plus faible comparée aux autres souches, aussi la souche de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* ($0,56h^{-1}$) ;

Les cinétiques de croissances des souches ((MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) sont représentées dans la figure suivante :

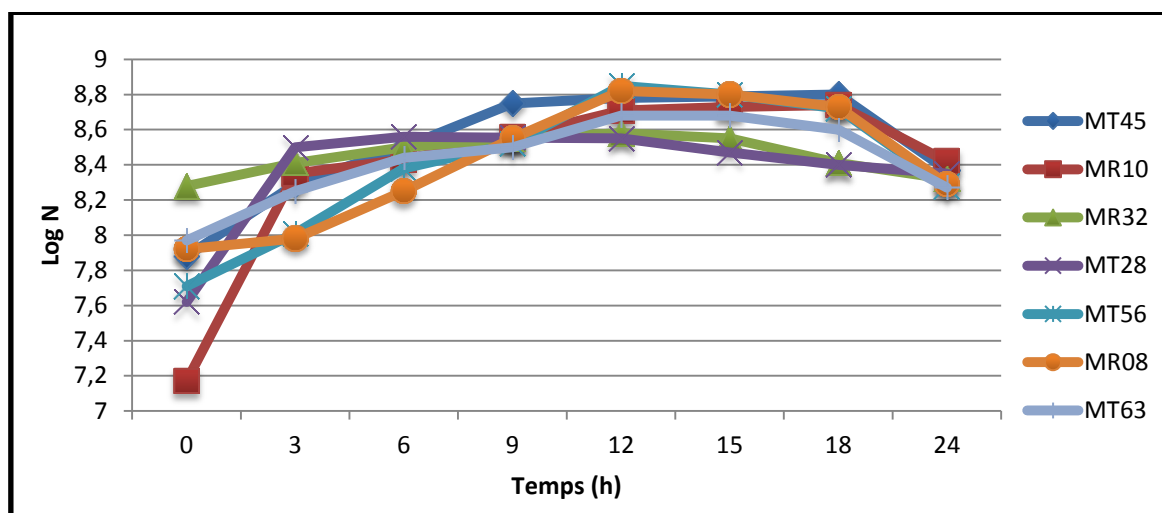


Figure 33. L'évolution de la biomasse sur milieu Elliker lactosé des souches dans le lait écrémé.

C. Pouvoir aromatisant :

La valeur du dosage de diacétyle pendant 48 h de la souche MR32 dans le lait écrémé est illustrée par la représentation graphique suivante : (**Figure 34**).

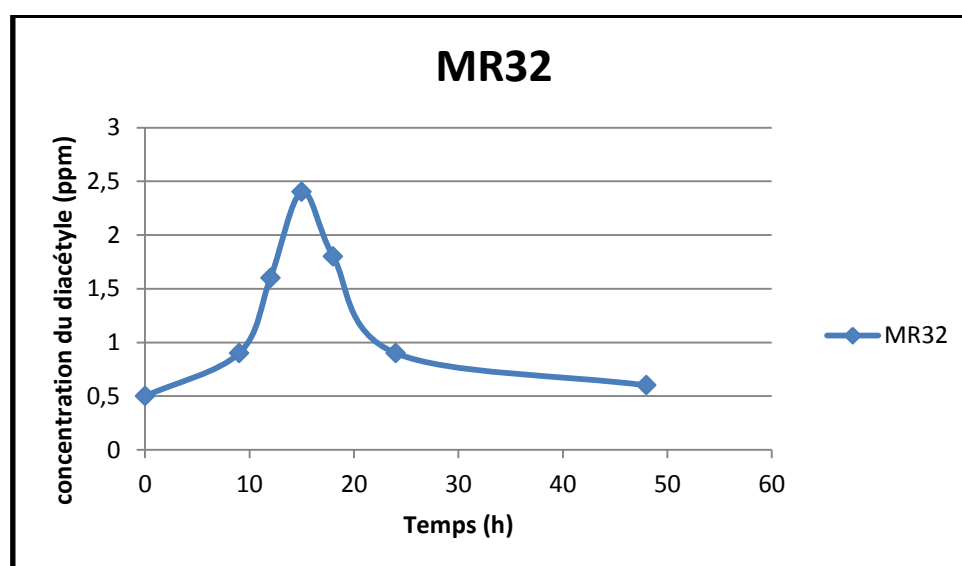


Figure 34. Evolution de la production du diacétyl par la souche MR32.

2.6. Etude de la cinétique des souches (MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28) en culture mixte :

Les mêmes paramètres (évolution du pH, production du diacétyl et l'acidité produite) ont été suivis pendant 48 h en culture mixte des trois souches.

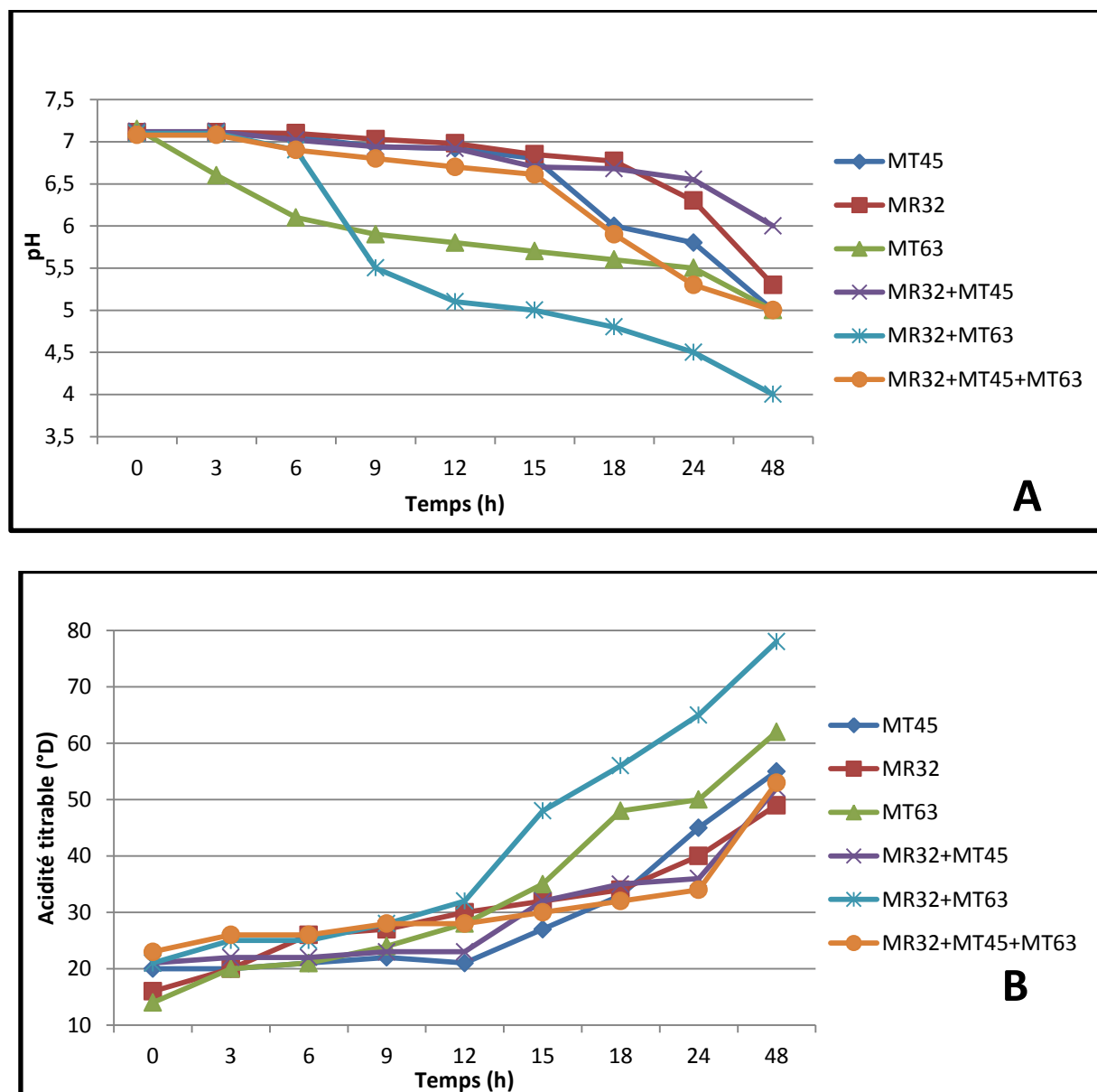


Figure 35. Cinétiques d'acidification des trois souches en culture mixte dans le lait écrémé, évolution du pH (A), évolution de l'acidité titrable (B)

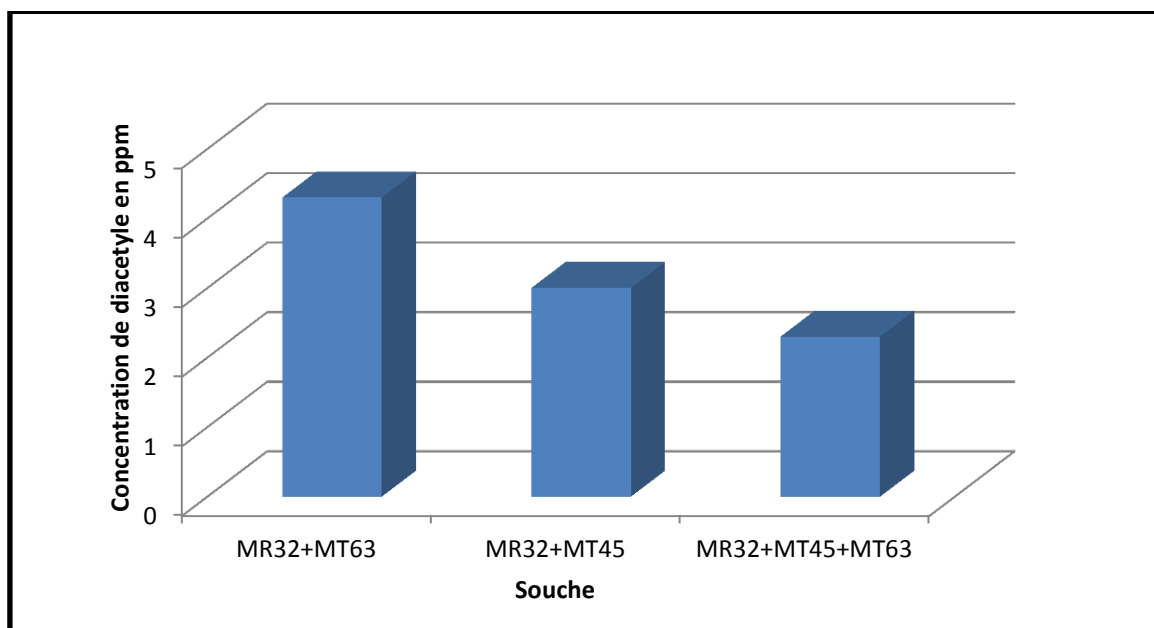


Figure 36. Histogramme de la production du diacétyl par la souche MR32 en culture mixte.

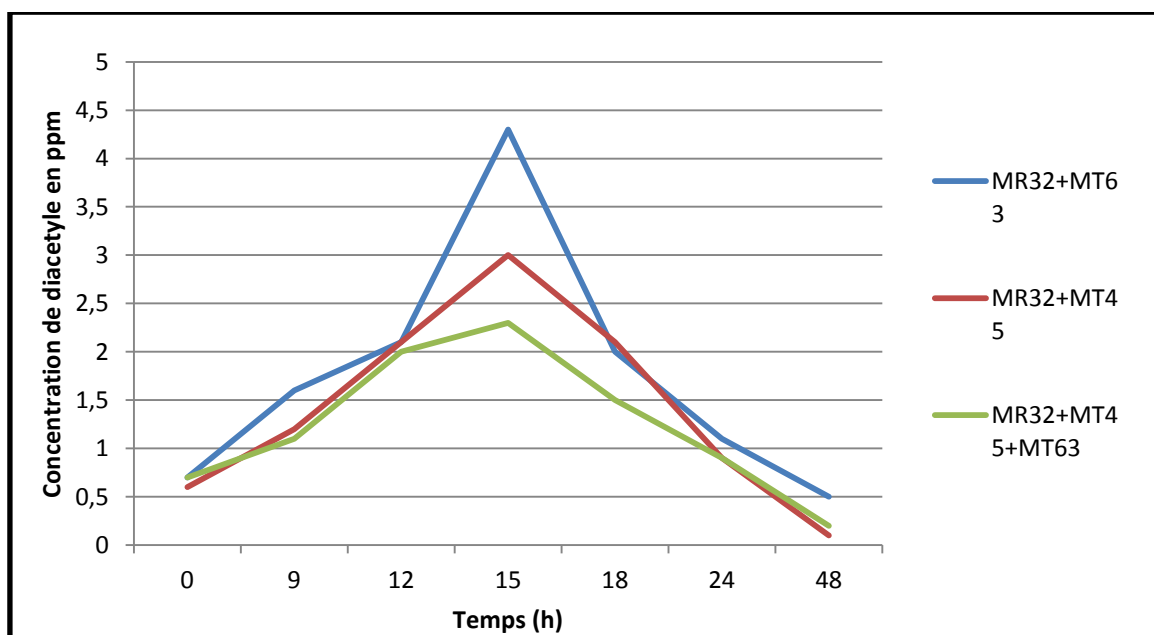


Figure 37. Evolution de la production du diacétyl par la souche MR32 en culture mixte.



time for discussion

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

Il ressort de nos résultats du (Tableau 11) que le temps de décoloration de bleu de méthylène des échantillons est survenu après 4 heures. Cette réduction lente du bleu de méthylène, s'explique par une faible charge microbienne. Cela va en concordance avec les résultats de Larpent (1997) où la qualité hygiénique des laits collectés peut être considérée comme bonne. Ceci indique que nos différents échantillons du lait cru de chamelle analysés sont de bonne qualité hygiénique ; indiquant que la charge microbienne est très faible. La richesse du lait en protéines protectrices (Lf, Lz, Ig) en serait responsable. En effet, la recherche de microorganismes indicateurs de contamination d'origine fécale permet de juger l'état hygiénique d'un produit. Selon Labioui (2009), même à des niveaux faibles, témoigneraient de conditions hygiéniques dégradées lors de la traite ou au cours de transport.

Dans le milieu PCA, il y a apparition de deux différents types de colonies: blanches et jaunes, de différentes tailles, formes arrondie ou lenticulaire (Figure 10). Ces résultats sont proches à ceux cités par Djerroumi et Ouhocine (1999) et Zahran et Al-salah (1997). Les deux auteurs ont isolés à partir d'un lait camelin, une flore représentée par les germes à Gram positif qui sont : *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* et *Streptococcus* et des germes à Gram négatif *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* et *Aeromonas* et *Pseudomonas fluorescens*. Nos échantillons étudiés présentent une charge en FTAM variant de 2.3×10^3 à 5.4×10^4 UFC/ml, ces valeurs sont proches de celles rapportées par Debouz *et al.* (2014), mais elles restent inférieurs à celles trouvées par d'autres auteurs : Adugna et Asresie (2014), Zarei yam *et al.* (2014), Chethouna (2011), Tourette *et al.* (2003) et Benkerroum *et al.* (2004). En effet, d'après Aggad (2009), ces seuils de contaminations en flore totales ne dépassent pas la norme Algérienne fixée à 10^5 UFC/ml.

La flore mésophile aérobie nous renseigne toujours sur la qualité hygiénique du lait cru, elle est considérée comme le facteur déterminant la durée de conservation du lait frais (Guinot-Thomas *et al.*, 1995). C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques. Selon de nombreux auteurs, le lait de chamelle a des propriétés antibactériennes élevées qui lui assurent une bonne conservation au frais sans fermentation immédiate. Ce constat s'oppose à la charge microbienne anormalement élevée dans les échantillons analysés. Dans ce sens, Calvo et Olano (1992) signalent que quand le lait est collecté sous des conditions hygiéniques convenables, sa flore totale ne dépasse pas 10^3 à 10^4 UFC/ml.

Le faible nombre de germes est le résultat de bon état de santé, des propriétés intrinsèques et de la très bonne position anatomique naturelle de la mamelle (Debouz *et al.*, 2014).

Les entérobactéries peuvent être pathogènes (cas d'*Escherichia coli*). Le développement de germes dans le milieu Mac Conky indique que le lait utilisé a subi une contamination exogène, due probablement aux conditions hygiéniques de la traite.

Donc, l'existence d'entérobactéries n'indique pas nécessairement la contamination directe fécale d'un lait de chamelle, mais il montre une preuve des mauvaises pratiques d'hygiène pendant la traite (Zarei yam *et al.*, 2014).

Dans cette étude, nous avons constaté que la majorité des échantillons analysés ne présentent aucun résultat positif des entérobactéries mis à part les échantillons (1, 2,7) contiennent respectivement 6, 11, 8 colonies, qui sont inférieurs à celle mentionnées par Zarei yam *et al.* (2014) et El-ziney et Al-turki (2006).

En suivant les résultats récapitulatifs (Tableau 14), les coliformes totaux atteignent une valeur maximale de 205×10^2 UFC/ml, avec la valeur minimale de 0.3×10^2 UFC/ml. Quant à la charge en coliformes totaux trouvée, elle est inférieure à celle signalée par Zarei yam *et al.* (2014), Chethouna (2011) et Tourette *et al.* (2003). Elles sont capables d'avoir des effets néfastes sur le lait et indiquent une contamination d'origine fécale, les produits résultants ont un goût désagréable. La présence de ces germes dans le lait indique clairement que le lait a été contaminé par des matières fécales au cours de la traite ou de l'absence d'hygiène. Selon Omer et Eltinay (2008) et El-agamy *et al.* (1992) et Barbour *et al.* (1984).

Dans notre échantillonnage, aucun résultat positif n'a été détecté pour les coliformes fécaux. Notons que les laits crus de chamelle testés présentent une qualité microbiologique relativement bonne et sont acceptables du point de vue hygiénique. Ainsi l'absence de salmonelles de staphylocoques et de clostridiiums reflète la bonne santé des chameaux des deux étables et une bonne hygiène de la traite (Adugna et Asresie, 2014). D'une autre part, contrairement à ce résultat, Matofari *et al.* (2007) ont rapporté qu'à partir de 196 échantillons testés, 84 d'entre elles contiennent des *Salmonella* spp. Sa présence pourrait être due aux mauvaises pratiques de manipulations. Zarei yam *et al.* (2014) signalent la même remarque rapportée.

Tous les échantillons étudiés sont dépourvus de streptocoques fécaux sauf le second.

La lecture sur la table de Mac crady (voir annexe) donne NPP de 0.3 germes par 1 ml de lait analysé. Ces valeurs sont proches de celles obtenues par Aggad *et al* (2009) ; et sont inférieures à celles citées par Saleh et Faye (2011), Barbour *et al.* (1985), Woubit *et al.* (2001) et Wanjohi *et al.* (2013). Le deuxième échantillon présente une charge supérieure à celle définie par la norme Algérienne. Ces germes sont des indicateurs de contamination fécale l'indice de manipulation non hygiénique. Leur abondance dans le deuxième échantillon reflète une non-observance des dispositions sanitaires requises au cours de la traite et de la récolte du lait, une contamination au cours du transport ou d'un stockage défectueux. Les principaux vecteurs sont la peau des trayons, souillée par les fèces et le matériel de traite mal conçu et donc se nettoyant mal. (Aggad *et al.* 2009).

On constate que les bactéries lactiques apparaissent sous la forme de deux colonies crémeuses lisses et marron de taille différentes en surface et profondeur. Le milieu MRS montre le développement d'un type de colonies blanchâtre et jaunâtre en forme arrondie ou lenticulaire. Ces colonies indiquent la présence de bactéries lactiques qui responsables à des fonctions importantes dans le lait.

La population des bactéries lactiques dans nos échantillons se chiffre par des dizaines et centaines de milliers par 1 ml de produit. C'est la preuve que les laits sont vivants. Le dénombrement de ces bactéries présentent des résultats très importants qui allant de 6.3×10^9 UFC/ml à 7.1×10^7 UFC/ml comme valeur minimale. Les analyses microbiologiques ont montré que les échantillons de lait camelin analysés sont de bonne qualité hygiénique. Les auteurs Kamoun (1990), Yagil (1994) et d'autres encore s'accordent sur le fait que la qualité bactériologique du lait camelin peut être irréprochable si la traite est effectuée dans les conditions hygiéniques requises. Alors d'une manière générale, le système protecteur particulier du lait camelin, la Lactopéroxydase en l'occurrence, présentant un effet bactériostatique contre les bactéries à Gram positif, peut justifier les résultats relatifs à l'évolution des germes halotolérants lors de la transformation naturelle du lait en lait fermenté (Chamba *et al*, 1994 ; Gnan *et al*, 1994). Cet effet est dû particulièrement à l'activation du système Lactopéroxydase–thiocyanate, présent dans le lait des mammifères générant par oxydation deux puissants inhibiteurs bactériens à savoir : l'hypothiocyanate (OSCN) et l'acide hypothiocyanéux (HOSCN-) (Klaenhammer *et al*, 1994). En effet, Selon Barbour *et al*, (1984), la teneur en lysozyme varie considérablement avec le stade de lactation et se situe entre 62 et 648 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ alors que Duhaime (1988) ont signalé 500 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. Cette glycoprotéine présente en effet, une action bactéricide car elle dégrade la paroi des cellules

bactériennes (El-sayed *et al*, 1992). La Lactoferrine intervient également en agissant sur *Escherichia coli* qui présente un besoin important en fer (El-sayed *et al*, 1992). Les Immunoglobulines ont par contre, un faible effet contre les bactéries. L'action faible des Immunoglobulines contre les bactéries serait du fait que les sites de fixation de leurs enzymes soient inaccessibles (Lauwereys *et al*, 1998).

Récemment, des auteurs ont rapporté un effet des immunoglobulines contre les rotavirus (El-agamy *et al*, 1992), ce qui pourrait expliquer l'origine des propriétés médicinales du lait camelin, ainsi que son utilisation par les nomades pour traiter la diarrhée (Siboukeur, 2007) Enfin, Gnan *et al*. (1994) ont mis en évidence une activité anti-levurienne du lait camelin sur *Saccharomyces cerevisiae* qui serait maximale dans le lactosérum par rapport au lait entier.

Après avoir maintenu des milieux de culture adéquats, un dénombrement primitif de la flore totale lactique a été effectué et qui nous a permis de déterminer la capacité sélective de chaque milieu, signalons que Elliker été plus sélectif que M17 et une réduction très importante de la microflore totale a été enregistrée après l'ajout des deux antibiotiques séparément pour le triméthoprim un pourcentage de 98% et 97% sur Elliker, M17 respectivement sont obtenus.

Pour la rifampicine le taux de réduction varie selon les concentrations utilisées. L'observation phénotypique des isolats a montré une prévalence très élevée du genre *Lactococcus* dans la flore totale et d'après les tests physiologiques et biochimiques, une prédominance de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* avec un pourcentage de 50% par rapport aux autres espèces minoritaires. Ce pourcentage détermine la compétition dans le milieu de culture entre les différents micro-organismes et explique dans ce cas la séquence des bactéries et la supplantation de *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris*.

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques et le profil fermentaire des sucres des isolats sont présentées dans les Tableaux (20, 21, 22).

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés des cocci à gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. Vingt (20) isolats sont ADH-, ne produisent pas d'acétoïne, **MT6** n'hydrolyse pas l'esculine ne dégrade pas le citrate ne pousse pas à 4% ni à 40°C (Badis *et al* 2004). Certains isolats **MT82, MT214, MT36, MT1, MT11, MT48, MR32', MT16, MT12** et **MT70** poussent à 40°C et à 4% de NaCl sauf **MT12** et **MT70** qui ne peuvent pas croître à 4% NaCl. d'autres isolats poussent à pH 9,6 et

qui sont **VT80**, **VT16**. D'autres souches hydrolysent l'esculine et métabolisent le citrate **MT46**, **MT2**, **MT44'**, **MT63'**, **MT26**, **MT45**, **MT166**. Ces isolats peuvent s'apparenter à *Lactococcus lactis* subsp. *Crémoris* fermentent peu d'hydrocarbures (Badis *et al* 2014 ; Guessas et Adjoudj., 2012 ; Hadeff, 2012) majoritairement ces isolats fermentent le mannitol, le D-xylose et fermentent rarement le maltose et l'arabinose, ne fermentent pas le raffinose ni le ribose ni le glycogène ni l'inuline.

Les souches (**MR16**, **MR18**, **MT63**) sont ADH⁺, ne produisent pas l'acétoïne, ne réduisent pas le citrate n'hydrolysent pas l'esculine et poussent à 40°C résistent à 4% de NaCl certaines espèces hydrolysent l'esculine **MR16**, **MR18**, **MT63** (esc⁺) le profil fermentaire de **MR18** montre que les espèces de cette isolats fermentent majoritairement le ribose, mannitol, lactose, amidon, maltose, fructose, saccharose ne fermentent pas le rhamnose et le sorbitol. Ces isolats sont pré-identifier *Lc. Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Sharpe, 1979 ; Schleifer *et al.*, 1985 ; Barlows *et al.*, 1991). Les deux isolats **MR24**, **MR12** ne résistent pas à 40°C ni à une concentration 4% NaCl, sont pré-identifier *Lactococcus lactis* subsp. *hodinea* . Notre résultat semble très similaire à celui décrit pour *Lactococcus lactis* subsp. *hodinea* (Badis *et al* 2004). Les deux isolats sont ADH⁺, produisent l'acétoïne, n'hydrolysent pas l'esculine, dégradent ou non le citrate et poussent à 40°C et à 4%.

MR17 fermente l'arabinose le mannitol, lactose et ne fermente pas le ribose le sorbitol le raffinose et l'amidon **MR32** cette isolat est capables de métaboliser le citrate et de pousser à pH 9,6. Ces isolats peuvent s'apparenté à *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Badis, 2004 ; Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al* ., 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Les isolats (**MT13**, **MT120**, **MT94**, **MT56** et **MT78**) n'hydrolysent pas l'arginine et produisent de l'acétoïne et fermentent le raffinose, n'hydrolysent pas l'esculine (esc⁻), dégradent le citrate (cit⁺) résistent à une concentration de NaCl 4% et à une température de 40°C (**MT13**, **MT120**) d'autres espèces peuvent hydrolyser l'esculine (esc⁺) et ne réduisent pas le citrate (cit⁻) **MT94**, **MT56**, **MT78** hydrolyse l'esculine (esc⁺) et réduise le citrate (cit⁺). Ces souches fermentent le raffinose et ne fermente pas le sorbitol et peuvent s'apparenter à *Lc raffinolactis* (Badis *et al.*, 2004) (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Les deux souches : **MT28** et **MT44** n'hydrolysent pas l'arginine et produisent de l'acétoïne. **MT28** hydrolyse l'esculine (esc⁺), réduisent ou non le citrate (cit⁻), **MT44** hydrolyse l'esculine (esc⁺) et métabolise (cit⁺) et peut croître à 40°C. Ces deux isolats ferment différemment le maltose ne fermentent pas sorbitol mannitol, lactose, amidon,

fructose, l'arabinose, saccharose, fructose, raffinose, d-xylose. Ces isolats peuvent s'apparenter à *Lc. plantarum* (Badis *et al.*, 2004) (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Chez certains isolats même espèce peut présenter souvent des profils fermentaires atypiques rendant ainsi leur identification difficile, voire même impossible.

MT10, MR25, MR13, MR07, MR10, MT90 : ces isolats hydrolysent l'arginine (ADH+) ne produisent pas de l'acétoïne Et poussent à 40°C résiste a 4% de NaCl. Certains de ces espèces sont incapables de pousser à pH = 4 N'hydrolysent pas esculine et dégradent le citrate. La souche **MR07** est incapable de fermenter tous les sucres testés. **MR13** fermente le mannitol le D-xylose l'arabinose rhamnose et le saccharose.

Ces isolats peuvent s'apparentées à *Lc. piscium* ou *Lc. lactis* subsp. *hordniae*. *Lc. lactis* subsp. *graviae*. La distinction entre les caractères phénotypique et les tests physiologique et biochimique était difficile à éclaircir. Seul l'outil moléculaire pourrait les sélectionner. A cet effet, pour éviter toute équivoque, nous avons jugé utile de nous limiter au genre *Lactococcus* sp. Certains isolats si l'on compare le profil des sucres, nous remarquons qu'une même espèce de bactéries lactiques peut présenter des biotypes différents : quelques souches fermentent différemment certains sucres à savoir l'arabinose, le raffinose, le sorbitol et le saccharose. Et appartenant à la même espèce, nous remarquons aussi d'après nos résultats une prévalence très élevée de *Lc lactis* subsp. *cremoris* représentant **50%** du genre *Lactococcus*. Suivi par **12,5%** de *Lactococcus raffinolactis*, et un faible pourcentage des autres espèces ainsi leur taux est :

Souches préidentifiées *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* avec un taux de **7,5%**. *Lactococcus lactis* subsp *hordinea* **5%** et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* **5%**, *Lc. Plantarum* **5%**. *Lactococcus* sp soit un pourcentage de 15%.

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

Les résultats du tableau (23) montrent que la rifampicine et triméthoprim ont permis la croissance des deux espèces suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, avec un taux plus élevé de ces espèces au niveau du triméthoprim, cela s'exprime par la capacité du triméthoprim à sélectionner ces deux espèces et par la résistance

de ce deux espèces à ces deux antibiotiques. En revanche *Lactococcus raffinolactis* et *Lactococcus plantarum* ont été seulement observé sur milieu additionné du triméthoprine ce qui signifie que la concentration de la rifampicine peut présenter un effet antagoniste pour ces deux espèces. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* Biovar. *diacetylactis* a été seulement observée sur le milieu additionné au rifampicine (0,3mg/ml) ainsi que *hordniae* donc le triméthoprine (0,5mg/ml) ne permet pas le développement de ces dernières. constatons que chaque antibiotique a une spécificité de sélectionner certaines espèces en inhibant d'autre telle que l'apparition des deux espèces *Lactococcus raffinolactis*, et *Lactococcus plantarum* en présence de triméthoprine contrairement à *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* subsp.*hordniae*. Donc, l'utilisation des deux antibiotiques associés ne permettra pas de sélectionner toutes les espèces présentatrices du genre *Lactococcus*.

A la lumière de ces résultats ; la concentration (CMI) *Lactococcus raffinolactis* et *Lactococcus plantarum* est supérieure à 0,5mg/ml de triméthoprine et inférieure ou égal à 0,3mg/ml de Rifampicine.

Matoh *et al.*, (1994) ont observé que l'augmentation de la concentration de la vancomycine ralentit la croissance et diminue le nombre de *Lactococcus lactis* en revanche les espèces de *Leuconotoc* résistent. Cependant, l'apparition du genre *Lactococcus* sur les milieux testés avec une prévalence élevée s'accorde avec les résultats de Giraud (1997) à 4µg/l de triméthoprine et de rifampicine qui il a eu une bonne croissance dans le milieu liquide pour l'espèce *Lactococcus lacits*. Et celui de Ziani (2008) qui a enregistré 48% de résistance à la rifampicine chez des lactocoques.

Une grande diversité microbienne à pousser sur Elliker en revanche M17 ce qui conduit à conclure que Elliker favorise plus le développement des espèces de lactocoque (Badis *et al.*, 2005) a utilisé Elliker pour l'isolement des souches de *Lactococcus* alors que le M17 l'utilisait pour l'isolement des *Streptococcus thermophilus*..

Le milieu M17 a permis le développement de tous les souches bactérienne testées alors que milieu Elliker modifié (avec l'addition du lactosérum)a sélectionné certaines souchesde *Lactococcus* (Gemelas *et al.*, 2013). Dans notre étude, l'antibiotique triméthoprine, et rifampicine jouent un rôle primordial dans la sélection des espèces du genre *Lactococcus*.

Une concentration de triméthoprime supérieur ou égal a 0,5mg/ml constitue un facteur antagoniste pour le développement des autres espèces et sont : *Lc lactis* subsp.*hordinea* et *Lactococcus lactis lactis* biovar.*diacetylactis*, en particulier *Lc lactis* subsp. *lactis* et *Lc lactis* subsp. *cremoris* sont communément impliquées, constituent les microorganismes dominants, où elles sont particulièrement abondantes (50%).

Nous remarquons que le milieu le plus favorisant de la croissance des espèces du genre *Lactococcus* c'était le milieu (Triméthoprime Elliker) et avec un pourcentage de réduction de la flore totale lactique plus élevé 98%.

La qualité d'un produit laitier fermenté reste toujours le souci des chercheurs, des producteurs et consommateurs, elle dépends en premier lieu du pouvoir acidifiant de ses ferments qui est un caractère de sélection très important ; car des souches fortement acidifiantes limitent la durée de conservation du produit fini et des souches faiblement acidifiantes sont à l'origine de défauts de qualité où elles provoquent, pour les fromages par exemple, un égouttage insuffisant et un risque de contamination par d'autres flores.

La cinétique de l'acidification du lait est essentiellement due à la production de l'acide lactique qui varie selon les souches (Moulay *et al.*, 2013). Sa mesure a été réalisé selon (Luca et Reyrolle, 1989 ; Chamba et Prost, 1989 ; Zourari *et al.*, 1991 ; Zanatta et Brasso, 1992 ; Thomas et Chamba, 2000) par neutralisation, à l'aide de la soude N/9, de 10ml de lait fermenté auquel est ajouté un indicateur de pH (solution alcoolique de 1% de phénolphthaléine, (1D°=0,1 g/l d'acide lactique) et par des mesures de pH et d'acidité dornic (D°) pendant 48 h.

D'après les résultats trouvés (Figure 32), nous avons constaté que les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* sont plus acidifiantes que celles de *cremoris* et *diacetylctis*, ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Cogan, (1980). Lucas et Reyrolle, (1989) ont testé la résistance des lactocoques aux acidités élevées et leurs résultats ont montré que les souches de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sont résistantes à une acidité de 85°D, ce qui n'est pas le cas avec les souches de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et de *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis* qui sont sensibles à cette acidité.

Si la coagulation survient à moins de 6 h elle est dite rapide, moyenne si elle survient au bout 6 à 8 h, par contre si l'acidification ne survient qu'après 18 à 24 h d'incubation elle est considérée comme lente. De manière générale on remarque que l'activité acidifiante

diffère selon les germes et les espèces et parfois au sein de la même espèce (cas de notre étude). Ceci nous a permis de classer les souches de bactéries lactiques selon leur aptitude acidifiante en 3 groupes :

Souche à pouvoir acidifiant élevé ou rapide si la coagulation survient au bout 6 h ou si le degré d'acidification D° supérieur ou égale à 65°D. Dans ce groupe on retrouve la souche MT63 qui produit une valeur très importante d'acide lactique (78°D).

Aussi l'association cette souche avec les souches MR32 et MT45 produisent 60°D d'acide lactique. Et la culture des deux souches MT63 avec MR32 produit une valeur d'acide lactique très intéressante (85°D).

Souche à pouvoir acidifiant moyen dont le taux d'acidification se situe dans l'intervalle 50et 65°D. Ce groupe est représenté par les souches MT45, MT28, MT56, MR08.

Souche à pouvoir acidifiant faible lorsque le taux d'acidification est inférieur à 50°D, ce groupe est représenté par les souches de sous-espèce de *diacetylactis* MR10 et MR32.

Nous remarquons également que le degré d'acidification en fonction du temps varie légèrement d'une souche à l'autre au sein de la même espèce *Lactococcus lactis*.

Les résultats obtenus indiquent qu'à t=0h, le pH initial du lait écrémé se situe entre (7 et 7,23)

Pour les souches lactiques testées et les cultures mixtes. L'évolution du pH est caractérisée par une diminution en fonction du temps et atteint la valeur de (pH=3,9)

Dans des expériences similaires, Labioui *et al.*, 2005, et Tabti, 2008, avaient trouvé que le genre *Lactococcus* possède un pouvoir acidifiant élevé avec un pH initial de 6,58 et un pH final de 4. Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Moulay *et al.*, 2013, et Badis *et al.*, 2004 Comparativement aux résultats trouvés par (Nehal, 2007) et (Metlef, 2008) ces résultats sont semblables. Ces souches ne peuvent pas être considérées comme des souches acidifiantes à cause de leur faible vitesse d'acidification pendant les premières 6 heures de la fermentation, elles peuvent donc être utilisées pour la production des saveurs et pour les opérations de post-acidification. (Lairini *et al.*, 2014). Les bonnes bactéries lactiques acidifiantes sont celles qui sont capables de réduire le pH du lait de sa valeur initiale d'environ 6,6 à 5,3 sur une durée de 6 heures. Sur cette base, une seule souche MT63 sur l'ensemble des isolats peut être considérée comme une bonne souche acidifiante.

Dans notre expérimentation, les conditions de fermentations étaient les mêmes pour tous les isolats. Par conséquent, les différences des propriétés acidifiantes dépendent de la spécificité de chaque souche et des espèces, comme il a été rapporté dans plusieurs études Badis *et al.*, 2004. L'auteur Novel, (1993) a montré que l'utilisation des associations bactériennes améliore les qualités organoleptiques des produits finis mais à conditions que les souches associées ont la capacité développer une bonne relation de symbiose entre elles. A la lumière de cette donnée, nous avons testé le pouvoir acidifiant et la production du diacétyl des cultures mixtes (MT63 avec MR32) et (MR32 avec MT45) et les 3 souches ensemble.

Nos observations ont porté également sur le temps de coagulation du lait a été obtenue après 24 h d'incubation, l'association des souches (MT63 avec MR32) ont été plus actives en coagulant le lait après seulement 9 h d'incubation, ce qui signifie que cette culture mixte a un pouvoir acidifiant plus important. Par ailleurs, il existe une relation étroite entre le pH et l'acidité Dornic, en effet au fur et à mesure que la quantité d'acide lactique produite augmente, le pH diminue.

Les résultats de la Figure (35) montrent que le pouvoir acidifiant des associations bactérienne (MT45 avec MR32) et (MT45, MR32, MT63) se rapproche, les valeurs oscillent entre 22 et 26°D Après 6h d'icubation et dépassent 28°D 9h après, l'acidité Dornic continue a augmenté pour atteindre 60°D après 48h.

L'ensemble de la souche MR32 et MT63 semble très acidifiants par rapport les autres associations bactériennes (MT45 avec MR32) et (MT45, MR32, MT63), cette co-culture a enregistré une valeur très importante d'acide lactique (85°D).

Des résultats analogues ont été rapportés par Metlef, 2008 et Nehal, 2007

Selon Rallu *et al.*, (2000), les levains lactiques mésophiles en association acidifient le lait en produisant de l'acide lactiques à travers leur métabolisme homofermentaire du glucose, lactose et galactose, exception faite pour la sous espèce *diacétylakis* qui ne peut pas métaboliser le galactose.

De même que, selon Payens, (1979) et Brussow, (2001), tous les travaux montrent qu'il existe une grande diversité d'activité parmi les bactéries lactiques, même si les méthodes employées ne sont pas toujours comparables ni bien adaptées à la prévision des performances industrielles. On peut même observer que les différences entre souches recouvrent largement

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

La mesure de la vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance ($\mu \text{ h}^{-1}$) reste un critère important dans l'appréciation des performances d'une souche microbienne. Ce paramètre est mesuré lors de la phase exponentielle de croissance tant que n'intervient pas un facteur limitant (Tableau 25).

En cours de la fermentation, la multiplication des cellules est bloquée par l'acidité développée. Les lactocoques ont un pH optimal d'action de 6,5 et un pH minimal de 4,5 (De Roissart, 1986). Au dessous de pH 4,5 ; l'activité et stabilité de nombreuses enzymes sont fortement réduites (Choisy, 1987). Des pH plus inférieurs provoquent des dommages cellulaires (Novel, 1993).

Ces résultats sont en accord à ceux rapportés par Moulay *et al.*, 2013 et Nehal, 2007

Les composés responsables de l'arôme des divers produits laitiers sont nombreux parmi lesquelles le diacétyle, l'acétaldéhyde et probablement le CO_2 et l'acétate sont les plus importants. A rajouter que certains auteurs Camus *et al.*, 1951 attribuent cette faculté également à l'acétoïne. Par contre, d'autres auteurs (Cogan, 1980 ; Sharp, 1978) affirment que l'acétoïne n'a ni saveur ni odeur.

Tous les composés aromatiques résultant de la dégradation du citrate qui, même n'étant présent dans le lait qu'en faible quantité (environ 8,3 mM) ils n'en représentent pas moins une constituante clef (Cogan, 1980).

Le diacétyle et l'acétoïne sont presque toujours étudiés ensemble. Ils sont très liés puisque le diacétyle donne par réduction de l'acétoïne. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, seul le diacétyle est aromatisant, ce qui justifie notre intérêt à cette substance. Les souches que nous avons retenues pour cette activité sont évidemment celles qui produisent du diacétyle en quantité appréciables ; c'est le cas des souches de *Lactococcus lactis biovar diacetylactis*.

Nous avons noté des valeurs maximales sont celles des souches MR32 et MR10 correspondant respectivement à 2,4 et 2,2 ppm après 15 h de culture. les autres souche ont marqué des valeurs plus faibles. ces résultats sont similaires à celle des traveaux de Nihal, 2007. Par ailleurs, comparer la souche qui atteint une valeur maximale (MR32) à une souche

mésophile aromatisante qui est *Leuconostos cremoris*, Cogan (1980) trouve que le maximum de diacétyl produit est de 6 ppm dans le milieu enrichi de 0,3% d'extrait de levure.

Le diacétyl a été estimé après 9h de fermentation presque pour toutes les souches étudiées et même pour l'association bactériennes. après 18h on assiste à une production maximale de diacétyl. Au-delà la cette durée la teneur en diacétyl décroît progressivement en raison de l'activité de la diacétyl-réductase enzyme impliquée dans la réduction du diacétyl en acétoïne cette réaction est irréversible.

La formation de diacétyl ne débute que tardivement, ce phénomène a déjà été remarqué par certains auteurs ; on peut l'expliquer par le fait que la souche de *Lactococcus diacetylactis*, étant de pouvoir acidifiant faible mettent un certain temps (entre 6 et 8h) pour abaisser le pH à un niveau favorable à la production du diacétyl. Desmazeaud, (1983) note à ce sujet ; la première enzyme induite dans le métabolisme du citrate, le citrate perméase, est pH dépendante, elle est fonctionnelle aux pH inférieure à 6. Par ailleurs, Sharpe, (1978) a trouvé que l'utilisation du citrate était plus active à des pH plus acides et en application pratique dans la composition des levains mixtes, en associant des souches grandes productrices d'acide avec *lc.diacetylactis* afin d'obtenir de grandes quantité de diacétyl.

Les valeurs du diacétyl obtenues pour la souche *Lactococcus diacetylactis* MR32 en association avec la souche MT63 augmente pour atteindre 4,3 ppm après 15h d'incubation. Selon Bassit (1994), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* joue un rôle primordial dans l'initiation de l'acidité pour rendre le milieu favorable à la production du diacétyl par le *biovar diacetylactis*. A savoir que, l'ensemble des souches MT45 et MR32 aussi remporte une valeur importante de diacétyl (3 ppm) après 15 h d'incubation.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Le lait de chamelle présente sans aucun doute un intérêt particulier pour les nomades et les populations du sud, car il est parfaitement conforme aux exigences de l'homme vu sa haute teneur en nutriments de base (protéines, lipides et lactose).

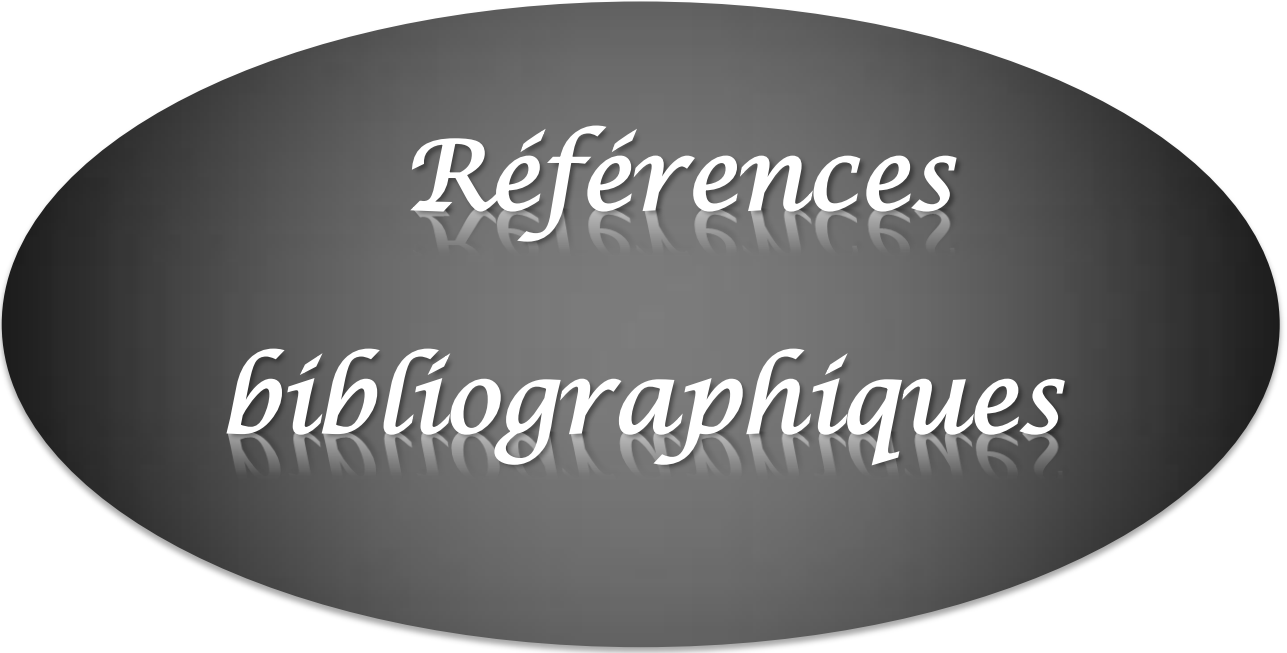
La qualité hygiénique de ce lait, le teste réductase montre que le taux de bactéries mésophile aérobie totale est inférieur à la norme, et celui des coliformes est 2.5×10^2 UFC/ml, temps de réduction du bleu de méthylène est estimé de 4 heures, ce qui montre que nos échantillons sont bons.

A partir de 80 isolats isolées et purifiées, on est arrivé à identifier 40 souches de diverses espèces de *Lactococcus*, aussi la détermination de la CMI des antibiotiques entrepris permettant une sélection distinctive entre les espèces du genre *Lactococcus*.

L'étude de la cinétique d'acidification et de croissance de deux souches en culture pure et en culture mixte dans le lait écrémé a révélé qu'elles possèdent un pouvoir acidifiant et une production de diacétyl très importants.

Nos résultats assez intéressants ouvrent les perspectives :

- Tester profondément la sélectivité des milieux élaborés.
- L'identification moléculaire des souches étudiées.
- Il serait intéressant de tester les pouvoirs lipolytique, antagoniste et protéolytique des souches identifiés.
- Essayer de fabriquer un lait fermenté à l'aide des souches lactiques testées.



Références

bibliographiques

BIBLIOGRAPHIE :

- Abdel-Moneim E.S.; Abdalla A.I. Et Ahmed E.E. (2006).** Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 321-328.
- Abu-Lehia I.H. (1987).** Lactation of camels and composition of milk in Kenya. *Milchwissenschaft*, **42**, 368-371.
- Abu-Tarboush H. M. (1996).** Comparison of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.*, **79**, 366-371.
- Abu-Tarboush H. M.; Al-Dagal M.M. Et Al-Royli M.A. (1998).** Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.*, **81**, 354-361.
- Accolas J.P., Bloquel R ; et Regnier J.(1977).** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ; *le lait*. 67 : 1-23.
- Aggad H., Mahouz F., Ahmed Ammar Y., Kihal M.,(2009).**- Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien, *Revue Méd. V*, N° 16012, Oran:591 ,593.
- Agrawal R. P.; Swami S. C.; Beniwal R.; Kochar D. K.; Sahani M. S.; Tuteja F. C.; Ghouri S. K. J. (2003).** Effect of milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled study. *J.Camel Res. Pract.*, **10**, 45-50.
- Ahmed Abdel-Hameid A., Sayed R ., Sayed M.,(2014).**, Nutritional value and sanitary evaluation of raw Camel's milk., *Emir. J. Food Agric.* **26** (4): 317-326.
- Ahmed Faris, Mohd Adnan , Irene K.P.Tan , (2007).**Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assesment of the isolates for industrial potential .*Bioresource Technology* .98: 1380-1385.
- Al-Zouzoreky. N et Sandine W.E. (1991).**, *Lactococcus* genuis, a selective and differential agar medium ; Volume 56, NO. 6 *Journal of Food Science-* 1729.
- Ammor M.S. et Mayo B. (2007).**, Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* **76** : 138-146.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., Isabelle Chevallier, I. (2005).** Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *food microbiology*, **22** : 373-382.
- Archambault M, (2004).**, Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire., Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-35.
- Aussel X. (2002).** Etude de bactéries lactiques isolées du shubat. Rapport de stage au CIRAD-AMIS, BTSA industrie agroalimentaire.
- Axelsson L. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. et Von Wright, A. (Ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.
- Bachmann,H., Starrenburg, M.J., Molenaar, D.,Kleerebezem,M., et Van Hylckama V.J.E.,2012.** Microbial domestication signature of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* **22**: 115-24.
- Bachmann,H., Starrenburg, M.J., Molenaar, D.,Kleerebezem,M., et Van Hylckama V.J.E., (2012).** Microbial domestication signature of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* **22**: 115-24.
- Badis,A.,Laouarbdia Selami,N.,Guertarni,D., Kihal,M., et Ouzrout,R.,(2005) .** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *Sciences et Technologie*. **23**: 30-37.
- BadisA, Guertarni D, Moussa Boudjemac B, Henni .D.J and Kihal.M , (2004).**,"Identification and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat Milk of Four Algerian Races," *Food Microbiology*, Vol. 21, No. 5, 2004, pp. 579-588.
- Balla A.(2011).** Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin. Thème de Magistère. Université d'ouargla.Algérie.

- Barat Ali Zarei Yam., Morteza Khomeiri., Alireza Sadeghi Mahounak., Seid Mahdi Jafari., (2014).** Hygienic Quality of Camel Milk and Fermented Camel Milk (Chal) in Golestan Province, Iran., *Journal of Microbiology Research*, 4(2): 98-103.
- Barbour E.K., Nabbut N.H., Frerichs W.N. and AL Nakhli h.M. (1984).** Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk ; relation to whey lysozyme and stage of lactation. *J. Food Protect.*, 47, 838-840.
- Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Frerichs, W.M., Al-Nakhli, H.M., Al-Mukayel, A.A. (1985).** Mastitis in *Camelus dromedarius* in Saudi Arabia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 17: 173 179.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.* 661-765.
- Bekhouche F., Boulahrouf M, (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie C – N°23*,38-45.
- Bengoumi M., Faye B. Et Tressol J-C. (1994).** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Benkerroum N. et Tamime A.Y., (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21 : 399-314.
- Benkerroum N., Boughdadi A., Bennani N., Hidane K., (2014).** Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 645–648.
- Brüssow H.,(2001).** Bactéries lactiques mésophiles. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55 : 283-303.
- Bunthof C.J., Van Den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F.M., Abee T. (1999).** Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 3681-3689.
- Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Cremoux R, Montel .MC.(2007).** Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 547-560.
- Calvo Mm., Olano A., (1992).** Thermal treatments of goat's milk, *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment*, Vol. 32, Espagne: 139,152.
- Carr F. J., Chill D., et Maida N. (2002) :** The Lactic Acid Bacteria:A Literature Survey.*Critical Rev. Microbiol.*, 28(4):281-370.
- Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. 2009.** Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int. J.Food Microbiol.* 133, 243-51.
- Chamba J. F , Bonnaz G. and Bourg P., (1981).** "Comparaisons de Diverses Méthodes de Dénombrement de la Flore Acidifiante du lait cru," *Le Lait*, Vol. 61, No. 609-610, 1981, pp. 555-567.
- Champagne C.P.n (1998).** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed :Maloine, Paris.
- Chelma A. (2003).** Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique .Niamey 5-8 Novembre. Niger.
- Chethouna F. (2011).** Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologiques du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Université Kasdi Merbah Ouargla.Algérie.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G. Et Leloir J., (1997).** La biochimie de l'affinage. Le fromage, partie 1, chap. 4, Edition Eck A., Gillis J. C. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP 86-164.
- Cogan T.M., (1980).** Les levains lactiques mésophiles. *Le lait*, 60 (597): 397-425.
- Correra. A. (2006).** Dynamique de l'utilisation des ressources fourragères par les dromadaires des pasteurs nomades du parc national du banc d'Arguin Thèse de doctorat du muséum national d'histoire naturelle discipline : écologie et gestion de la biodiversité. Muséum national d'histoire naturelle de paris. (Mauritanie) 362p.
- Cottin M. G. (2000).** Les animaux domestiques dans les sociétés pastorales nomades : Rôles économique et socioculturel. Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. France.
- Crider SR, Colby S D. (1985).** sensibilité des entérocoques à la triméthoprimé et sulfaméthoxazole-triméthoprimé. *Antimicrob Agents Chemother.*; 27. : 71-75.

- D'Aimmo, M.R., Modesto, M. et Biavati, B.(2007).**Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium isolated from dairy and pharmaceutical products .Int.J.Food Microbiol.115 :35-42.
- Da Cruz A. G. ; Faria J. A. F. Et Van Dender A. G. F. (2007).** Packaging system and probiotic dairy foods. Food Research International **40**, 951-956.
- Daly C.; Fitzgerald G. F.; O'connor L. Et Davis R. (1998).** Technological and health benefits of dairy starter cultures. International Dairy Journal **8**, 195-205.
- Daoudi L., (2000).**, Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis biovar. diacetylactis* UL719. , Thèse de doctorat. Faculté des études supérieures. Université Laval .Canada.
- De Fabrizio, S, V., Parada, J.L.et Ledford, R.A.(1994).**Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis* : an approach of genetic determinants location through a model system.Microbiol. Aliment. Nutr.12 :307-315.
- De Roissart H. Et Luquet F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.
- Debouz A., Guerguer L., Hamid Oudjana A., Hadj Seyd AE.,(2014).**,Etude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologiques du lait de vache et de lait camelin dans la wilaya de Ghardaïa.,Revuz Elwahat pour les recherches et les Etudes : 10-17.
- Dellaglio F. ; De Roissart H. ; Torriani S. ; Curk M.C. ; Janssens D., (1994).**Caracteristiques générale des bacteries lactiques in « Bacterie lactique », de Roissard et Luquet, Tech.Doc., Lavoisier, Paris.
- Dellaras, C., (2007),** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.Lavoisier Tec et Doc. Paris. PP 476
- Deroissart H.B., (1986).** Les bactéries lactiques: lait et produits laitiers vaches, Brebis, Chèvres. Ed. Arria, 3: 343-408.
- Desmaures N, Opportune W, Gueguen M. (1997).** *Lactococcus* spp. yeasts and *Pseudomonas* spp. On teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. Int. Dairy J. **7**, 643-646.
- Desmaures, N., Bazin, F., Gueguen, M., (1997).** Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. Journal of Applied Microbiology **83**, 53-58.
- Desmazeaud M.J., De Roissart H. (1994).** Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». De Roissard et Luquet, Tech.Doc.,Lavoisier, Paris.
- Desmazeaud, M.(1996).** Les bacteries lactiques dans : l'alimentation humaine : utilisation et innocuité.Chier Agricultures, 5,pp :331-343.
- Diallo B.C. (1989).** L'élevage du dromadaire en Mauritanie. Options Méditerranéennes Série Séminaires- n° 2 : 29- 32.
- Dicks LMT, Fantuzzi L, Gonzales FC, Du Toit M, Dellaglio M (1993).** *Leuconostoc argentinum* sp.nov isolated from argentine raw milk. Int.
- Djeroumi A, Ouhoquine N (1999).** Etude comparative des laits bovin et camelin : Caractéristique structurale et physicochimique et aptitude a la transformation en produit dérivés. -Synthèse des données bibliographique-, Mémoire d'étude supérieures en biologie, Tizi ouzou.Algérie.
- Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D (2010).**, Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. J Appl Microbiol **108**:647-657.
- Duhaiman A.S (1988).** Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. Comp. Biochem. Phys., **91**, 793-796
- El Sayed I., El Agamy E.Sa., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P. And Assaf R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. J. Dairy Res., **59** 169-175.
- Elagamy E.I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. Food Chemistry, **68**: 277-232.
- Elagamy E.I. ; Ruppanner R. ; Ismail A. ; Champagne C.P. Et Assaf R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. Int. Dairy J., **6**, 129-145.
- El-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P. And Assaf R. (1992).**Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective protein. J. Dairy Res., **59**, 169-175.

- Elkhidir H.E. (2002).** Vitamin C status in Sudanese camels. PhD Thesis, University of Utrecht (The Netherlands), 98 p.
- Elliker P. R., Anderson A. W. and Hannesson G.(1956),** “An Agar Culture Medium for Lactic Acid Streptococci and Lactobacilli,” Journal of Dairy Science, Vol. 39, No. 11, pp. 1611-1612.
- Elliker P. R., Anderson A. W. and Hannesson G., (1956),** “An Agar Culture Medium for Lactic Acid Streptococci and Lactobacilli,” Journal of Dairy Science, Vol. 39, No. 11, , pp. 1611-1612.
- Ellouze S. Et Kamoun M. (1989).** Evolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de lactation. Options Méd., **6**, 307-323.
- El-Ziney M.G., Al-Turki A.I., (2007).**, microbiological quality and safety assessment of camel milk (camelus dromedaries) in saudi arabia (qassim region)., Microbiological quality and safety assessment of camel milk in Saudi Arabia (Quassim region).
- Farah Z. (1993).** Composition and Characteristics of Camel Milk; review.J. Dairy Res., **60**, p 603-626.
- Farah Z. Et Rüegg M.W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. Food Microstruct., **8**, 211-116.
- Farah Z.; Streiff T. Et Bachman M.R. (1990).** Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. J. Dairy Res., **57**, 281-283.
- Farah Z.; Streiff T. Et Bachman M.R. (1990).** Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. J. Dairy Res., **57**, 281-283.
- Faye B. (1997).**Guide de l'élevage du dromadaire Libourne : SANOFI, - 126 p in CD ROM.
- Faye B. (2003).** Performances et productivité N laitière de la chamelle: les données de la littérature. Lait de chamelle en Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique .Niamey 5-8 Novembre. Niger.
- Faye B. (2009).** L'élevage des grands camélidés : vers un changement de paradigme. Renc.Rech. Ruminants, **16**, 346.
- Faye B. Et Mulato O.C. (1991).** Facteurs de variation des paramètres protéoénergétiques, enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. Rev. Elev.Méd. Vét. des Pays Trop., **44**, p 325-334.
- Faye B., Mulato O.C. (1991).** Facteurs de variation des paramètres protéoénergétiques, enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. Rev. Elev. Méd. Vét. des Pays Trop., **44**, p 325-334.
- Faye, B. (2002).** L'élevage du dromadaire dans le Monde. Cours Approfondi sur le développement de l'élevage camelin. Rabat, Maroc, 4-15 mars 2002.
- Faye, B. (2003).**Performances et productivité laitière de la chamelle : les données de la littérature « lait de chamelle pour l'Afrique ». Atelier sur la filière laitière cameline en Afrique. Compte rendu de la FAO, Niamey.
- Frank J. F. Et Hassan A. N. (1998).** Starters cultures and their use. In Marth, E. H. et Steele, J. L. (ed.). Applied Dairy Microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York, 131-172.
- Gao Y., Lu Y., Teng K. L., Chen M. L., Zheng H. J., Zhu Y. Q. & Zhong J., (2011),**,"Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women." J Bacteriol, , **193** (11), 2886-2887.
- Gauthier-Pilters H. (1981).** The camel. Its evolution, ecology, behaviour and relationship to man. University of Chicago press, Chicago (USA) ; 1-208.
- Gemelas L., Rigobello V., Ly-Chatain Mais H., Demarigny Y., (2013),** Sélécive *Lactococcus* Enumération in Raw milk.Food and Nutrition Sciences , **2013**, **4**, 49-58
- Gevers D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- Giraud A, Champailier A, Moulard S and Raimbault M. (1998),** Development of a miniaturized selective counting strategy of lactic acid bacteria for evaluation of mixed starter in a model cassava fermentation. Journal of Applied Microbiology **84**, 444–450.
- Gnan S.O., Mohamed M.O., Shereha A.M. Et Iwegbe A.O. (1994),** Fermentation ability of camel's milk. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

- Guessas B, Adjouj F, Haddadji Mand Kihal M.(2012).**, isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and their major Technological Trait. Laboratoire de microbiologie Faculté Des Sciences .Université D'es-senia Oran. Algeria
- Guessas B. and Kihal M.(2004).**, caractérisation Isolation of Lactic Acid bactéria isolated from Algeria arid zone raw goats milk Africa Journal of biotechnology,3,pp.339-342.
- Guessas B.(2007).**, Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran.Algérie.
- Guiraud J.P. (1997).** Microbiologie des principaux produits alimentaires ; in : « Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris.
- Guiraud J.P. et Galzy P., (1980).**, L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239.
- Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.
- Guiraud J.P., (2003).** Microbiologie Alimentaire. Tec &Doc, Dunod. Paris. 90-292.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. 1e Ed., Dunod. Paris. 136-144.
- Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.
- Guiraud J.P.,(1998).** Analyse du lait. Microbiologie alimentaire. Ed DUNO.651
- Guiraud, J.P (1998).**Microbiologie alimentaire. Thecnique et Ingenierie. Serie Agroalimentaire, Eds .Dunod Pris, 652 P.
- Hadef S., (2012).**, Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales.Mémoire de Magister soutenu le 18-04-2012. Université Kasdi Merbah-Ouargla.Algérie.
- Hamilton-Miller JM T. (1988).**, Reprise de l'activité de triméthopime contre cocci à Gram positif par la thymidine, la thymine et "folates." J Antimicrob Chemother.; 22 : :35-39.
- Hammes WP, Weiss N, Holzapfel WH (1992).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Barlows AHG, Trüper M, Dworkin W, HarderKH, Schleifer (Ed.). The prokaryotes. Springer Berlin p: 1534-1593.
- Harddy J., (1987) .**, le fromage .ED . A . Eck .Lavoisier TEC Et Doc , paris.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., (2009).** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre, p. 37-55.
- Harrigan WF, McCance ME (1976).** Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press London.
- Hasaine O.; Zadi-Karam H. Et Karam N-E. 2008.** Phenotypique identification and propeties of lactic acid bacteria isolated from three breads dromedary raw milks in south Algeria. Emir. J.Food Agric.20(1): 46-59.
- Hassaine O., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2007.** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*).Afr. J. Biotechnol. **6** (14) : 1720-1727.
- Hassan A.A.; Hagrass A.E.; Soryal K.A. Et El-Shabrawy S.A. (1987).** Physicochemical properties of camel milk during lactation period. Egyptian J. Food Sci., **15** , 1-14.
- Hassouna M. Et Masrar F. (1995).** Evolution de la flore microbienne et des principales caractéristiques physico-chimiques au cours de la maturation de fromage industriel tunisien à pâte pressée cuite de type gruyère. Ind. Agro. Alim., **112**, 911-922.
- Herrerros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Frenso, M.E. et Tornadijo, M.E.(2005).**Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a spanish goat's milk cheese).Food Microbiol. **22** :455-459.
- Hitchins,(1997).**, Mécanisme d'action de triméthopime-sulfaméthoxazole. J. Infect. Dis.128 (Suppl.) :433-436. [PubMed]
- Holzapfel W.H.; Haberer P.; Geisen R.; Björkroth J. Et Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. **73(suppl)**: 365S-73S.

Hugenholtz J.; Sybesma W.; Groot M. N.; Wisselink W.; Ladero V.; Burgess K.; Van Sinderen D.; Piard J.C.; Eggink G. J.; Smid E.; Savoy G.; Sesma F.; Jansen T.; Hols P. Et Kleerebezem M. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 217-235.

Huggins A. M. and. Sandine W. E.(1984), "Differentiation of Fast and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of *Streptococci*," *Journal of Dairy Science*, Vol. 67, No. 8, , pp. 1674-1679.

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

Idoui T., (2008). Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie.179.

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., (2009). Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk:Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, **60**(2) : 177-183.

Ismail M.D. Et Al-Mutairi S.E. (1998). Milk production potential of dairy camels in Northern Saudi Arabia. Dans *Dromadaires et chameaux, animaux laitiers: actes du colloque de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994*, Coll. Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 35-40.

Juillard V., le Bars D., Kunji E.R.S., Konings W.N., Gripon J.C., Richard J. (1995) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3024-3030.

Kamoun M. (1990). La production de fromage à partir du lait de dromadaire. *Option médit.* **12**, 119-124.

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

Kamoun M. Et Bergaoui R. (1989). Un essai de production et de transformation de lait de dromadaire en Tunisie. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **42**, 113-115.

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

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

Khanna N.D.; Sahani M.S. et Rai A.K. (1998). The camel as a milk animal in Indian experience. Dans *Dromadaires et chameaux, animaux laitiers: actes du colloque de Nouakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994*, Collection Colloques, CIRAD, Montpellier, France, 95-100.

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

Kihal M, Prevost H, Lhotte M.E, Huang D.Q, Divies C.(1996), Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J.Appli.Micobiol.***22** ,219-223.

Kihal M. , Prevost H., Henni D.E., Benmecherene Z., et Dives C., (2007).Carbone Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in single and Miculture with *Lactococcus lactis* in Skimmed milk. *Word journal of dairy & food science* **2**(2) : 62-68.

Klaenhammer T.R., Fremaux C. Et Hechard Y. (1994). Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques ; in " Bactéries Lactiques", de Roissard et Luquet, Tech. Doc.,Lavoisier, Paris.

Knoess K.H.; Makjdun A.J.; Rafiq M. Et Hafeez M. (1986). Milk Production Potential of the Dromadary with special reference to the province of Penjab *World Anim. Rev.*, **57**, 11 -21.

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

Konuspayeva G.; Faye B. Et Serikbaeva A. (2003). Les produits laitiers traditionnels à base de lait de chamelle en Asie Centrale. *Atelier Int. Sur le lait de chamelle en Afrique. FAO-CIRAD-KARKARA, Niamey (Niger)*, 5-8/11/03.

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

- Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., Belkhou R et Zerrouq F., (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir : Afrique SCIENCE 10(4) 267 – 277
- Laithir C. (2011).** Microflore du lait cru. Cnaol, 19- 20.
- Langella P. ; Nouaille S. ; Commissaire J. ; Bolotine A. ; Gruss A. Et Le Loir Y. (2001).** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Lait **81**, 19-28.
- Larpent J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
- Larpent J.P., Copin M.P., Germonville A., Jacquet M. Et Thetas J.L. (1997).** Microbiologie du lait et des produits laitiers ; in : « Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.
- Larpent J.P., G.M., (1990).** Mémento technique de microbiologie .2^{ème} edition.Lavoisier Tecet Doc.Paris .PP471.
- Larpent-Gourgaut M. , Michaux O. , Larpent J. P. , Desmasures N. , Desmazeaud M. , Mangin I. , Masson F. ,Montel M.C. , Tailliez P. (1997).** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: in : «Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.
- Lauwereys M., Arbabi-Ghahroudi M., Desmyter A., Kinne J., Hölzer W., De Gernst E., Wyns L. Et Muyldermans S. (1998),** Potent enzym inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. The EMBO Journal, **17**, 3512-3520.
- Lee J.Y., Kim C .J., et Kunz B., (2006) :** Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages .Meat Sci. 72:437-445.
- Lehninger A. L.(1981).** Biochimie bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème Ed, Flammarion médecine-science.
- Leroy F. et de Vuyst L., (2004).**Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industrie.Trends Food Sci.Technol.15 :67-78.
- Lhote H. (1987).** Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et au Sahara. Ed. Office National des approvisionnements et des services Agricoles- Alger ; 161 p.
- Loiseau G. ; Faye B. ; Serikbaeva A. Et Montet D. (2001).** Enzymes ability to serve as markers of pasteurized camel milk. Int. Conf. On new horizons in biotechnology, 18- 21 avril 2001, Trivandrum, Inde.
- Lopez, S et Mayo, B., (1997),** “Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses”. Lett. Appl. Microbiol, Vol. 25.n°,4 pp. 233-238.
- Loubiere P., Salou P., Leroy M.J., Lindley N.D., Pareilleux A. (1992).**Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. J. Bacteriol. 174 : 5302-5308.
- Louembé, D., Brauman, A., Tchicaya, F., Kobawila, S.C., (1996).** Etude microbiologique et biochimique de la bouillie de maïs “poto-poto”.Microbiologie, Aliments, Nutrition 14, 245–253.
- Lucas S. Et Reyrolle J., (1989).** Etude d'un lot de ferments lactiques msophiles. Equilibre de la flore au cours de la première étape de la fabrication du levain. Le lait, 69 (2) : 123-136.
- Marchal N., Obre A., Buttion R., Boudon J.L. Et Richard C.L. (1982).** Les Milieux de Cultures pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. DOIN, 2ème Ed., Paris.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K. and Holzapfel, W.H. (2004).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of Kulenaoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. Int. J. Food Microbiol. 94: 269–278.
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prevost, H., 8 Divies, C. (1994).** Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. Int. Daiv J., 4: 459-469.
- Mathot, KIHAI, M., Prevost, H., et Divies , C., 1991.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycine agar maedia .International Dairy Journal 4:459-469.
- Matofari, J. W., Y. Mario, E. W. Mwatha ., P. O. Okemo.(2003).** Microorganismsassociated with subclinical mastitis inKenyan camels (Camelus dromedarius). J.Trop. Microbiol. 2:11-16.
- Mauguin S., (1991):**Caracterisation de bactéries lactiques isolées de produits marins. Thèse de doctorat. IFREMER.Nantes.

- Mäyrä-Mäkinen A. Et Bigret. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-102.
- Mehaia M.A. (1987).** Studies on camel milk casein micelles ; treatment with soluble and immobilized pepsin. Arab Gulf J. Sci. Res. Agric. Biol. Sci., 3, 391-400.
- Mehaia M.A.; Hablas M.A.; Abdel-Rahman K.M. Et El-Mougy S.A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. Food Chem., 52, 115-122.
- Metlef S., (2008).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Mémoire de magister. Université Hassiba BEN BOUALI-Chlef. Algérie.
- Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. (2001).** La flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 575 – 592.
- Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., (2008).** Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. Dairy Sci. Technol. 88 : 695-705.
- Millière JB.(1994) :** Presence of *Carnobacterium* spp. In Fresh Surface mould ripened soft cheese. J Appl Bacteriol. 76:264-269.
- Mohamed M.A.; Larsson-Raznikiewicz M. Et Mohamud M.A. (1990).** Hard cheese making from camel milk. Milchwissenschaft, 45, 716-718.
- Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G.,(2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments .Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- Morot-Bizot S., (2006).** Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand),.
- Moulay M., Benlahcen K., Aggad H. et Kihal M., (2013).** Diversity And Technological Properties Of Predominant Lactic Acid Bacteria Isolated From Algerian Raw Goat's Milk., Advances in Environmental Biology, 7(6): 999-1007.
- Muhialdin B.J. and Z. Hassan (2011):** Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against *Aspergillus oryzae*. Am.J. Applied Sci. 8:447-451.
- Mukasa-Mugerwa. E. 1985.** Le chameau : étude bibliographique. CIPEA, ADDIS-ABEBA ; 118p.
- Mulugojjam A., Aleme A.,(2014).** Physicochemical and microbiological quality of one humped camel (*Camelus dromedarius*) milk: A Review., Journal of Biology, Agriculture and Healthcare ISSN 2224-3208.
- Nehal F.,(2007).** Isolement et caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* à partir de différents laits dans le périmètre du moyen Cheliff. Mémoire de magister soutenu le 30-09-2007. Université Hassiba BEN BOUALI-Chlef. Algérie.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., et Okamoto, T., (2006).** Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. Journal of Applied and Environmental Microbiology 101: 396-405.
- Novel, G. (1993).** Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les Micro-organismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.
- Ogawara, H .(1981).** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbiol .Rev. 45(4):591-619.
- Ouwehand A. C. ; Salminen S. Et Isolauri E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 82, 279-289.
- Patrignani F.; Lanciotti R.; Mathara J. M.; Guerzoni M. E. Et Paul Ross R.; Morgan S. Et Hill C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. Int. J. Food. Microbiol. 79: 3 – 16.
- Paul Ross R.; Morgan S. Et Hill C. (2002).** Preservation and Fermentation: present and future. Int. J. Food. Microbiol. 79:3-16.
- Payens T. A. J., (1979).** Casein micelles: the colloid-chemical approach. International Dairy Journal, 46 : 288-302.
- Perez, T., Balcazar, J.L., Peix, A., Valverde, A., Velazquez, E., de Blas, I., et Ruiz-Zarzuélan, I., (2011).** *Lactococcus lactis* subsp. *Tructa* isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61: 1894–1898.

- Peyre De Fabregues.(1989).** Le dromadaire dans son milieu naturel. Rev. Elev. Méd. vét. Paystrop., n°1 : p 127-132.
- Phalip V., Monneta C., Schmitt P., Renault P., Godonb J.J., et Divib C.,(1994).** Purification and properties of the α -acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis.*, NCDO 2118. FEBS Letters. 351 : 95-99.
- Pot B., (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.
- Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., (1996).**, Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. Syst. Appl.Microbiol. **19** : 213-222.
- Prat M.L. (1993).** L'alimentation du dromadaire. Thèse de Doctorat vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort ; n° 113 : 111 p.
- Pu .Z. Y. , M. Dobos, G. K. Y. Limsowtin and I. B. Powell, (2002).**,"Integrated Polymerase Chain Reaction-Based Procedures for the Detection and Identification of Species and Sub- species of the Gram-Positive Bacterial Genus *Lactococcus*," Journal of Applied Microbiology, Vol. 93, No. 2, pp. 353-361.
- Rademaker J.L.W., Herbet H., Starrenburg M.J.C., Naser S.M., Gevers D., Kelly W.J., Hugenholtz J., Swings J. & van Hylckama Vlieg J.E.T. (2007).** Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology 73, 7128-7130.
- Rallu F. (1999).**, Etude de la résistance au stress acide de *Lactococcus lactis*. Thèse doctorale, Université Paris 6, Paris, France.
- Ramet J. P. (2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.
- Ramet J.P. (1989).** L'aptitude fromagère du lait de dromadaire. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trp., **42**, 105- 111.
- Ramet J.P. (1993).** La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113.
- Rasolofo E .A. (2010).** Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Thèse de doctorat. Université Laval .QUÉBEC .CANADA.
- Raynaud S. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. DEA de génétique et physiologie microbienne, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. et Loubière P., (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. App. Env. Microbiol. 71(12) : 8016- 8023.
- Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. et Loubière P., (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. App. Env. Microbiol. 71(12) : 8016- 8023.
- Rodriguez J. M. ; Martinez M. I. ; Horn N. Et Dodd H. M. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology **80**, 101-116.
- Rosslund E. Andersen Borge G.I., Langsruda T., Sorhauga T.(2003).** Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. I.j. Food Microbiol. 89, 205-212.
- Ruas-Madiedo P.; Hugenholtz J. Et Zoon P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal **12**, 163-171.
- Sabumukama C. (1997).** Recherche d'enzymes adaptées pour la vérification de la pasteurisation du lait de dromadaire et mise au point d'un test simple de contrôle. Rapport de stage au CIRAD-SAR et ENSIA. Diplôme de Mastère Grandes écoles. Montpellier. 45 p.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah,F.,Badis,A.,Hadadji,M.,Henni D.E., Previst,H.,Kihal,M., (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. Journal Algérien des Régions Arides.01 :01-14.
- Saleh S.K., Faye B.,(2011).**, Detection of subclinical mastitis in dromedary camels (*Camelus dromedaries*) using somatic cell counts, california mastitis test and udder pathogen, Emir. J. Food Agric. 23 (1): 48-58

- Sanders J.W., Venema G., Kok J. (1999).**, Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol. Reviews. 23 : 483-501.
- Sawaya W. N., Khalil J.K., Al-Shalhat A. Et Al-Mohammad H. (1989).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. J. Food Sci., 49, 744-747.
- Sboui A., Khorchanit, Djegham M. Et Belhadjo. (2009).** Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. Afrique SCIENCE 05(2) (2009) 293-304.
- Schleifer K. H. kraus, Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins MD., Fischer, R. (1985)** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*. gen. Nov systematic and applied Microbiology. 6, 183-195.
- Sharp M. E. (1978).** The lactic acid bacteria (including *Leuconostocs*). XXème congré de laiterie. Paris.
- Sharpe M.E., Fryer T.F., Smith (D.G.) (1966).**, Identification of the lactic acid bacteria. In Gibbs (B.M.), Skinner (F.A.) (Eds.), Identification methods for microbiologists. Part A.- London: Acad. Press, , p. 65-79.
- Sherman J M, (1973),** the streptococci. Bacteriological review .1, 3-97.
- Siboukeur O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-Harrach-Alger. Algérie.
- Siezen, R.J., Starrenbourg, M.J.C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D et Van Hylckama Vlieg, J.E.T., (2007).** Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* plant isolates identifies adaptation mechanisms to the plant niche. Journal of Applied and Environmental Microbiology 74: 424-436.
- Simpkin S.P. ; Rowlinson P. ; Tullu D. Et Lesorogol P. (1997).** A comparison of two traditional camel calf management systems in Kenya and implications for milk production, J. Camel Pract. Res., 4(2): 229-234.
- Stiles M.E. et Holzapfel W.H., (1997).**, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36 : 1-29. *Streptococcus Thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) non. Rev. sist Appl. Microbiol. 14:386-388.
- Stuart M.R., Chou L.S., Weimer B.C. (1999).**, Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Env. microbiol. 65: 665-673.
- Swenson, J.M., Fcklam, R. R. et Thornsberry, C. (1990).** Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. Antimicrob. Agents Chemother. 34 :543-549.
- Tabti M., (2008).**, Effet de *Lactococcus lactis* locales sur des bactéries pathogènes impliquées dans la pathologie digestive in vitro., Mémoire de magister soutenu le, 29 octobre 2008. Université Hassiba BEN BOUALI-Chlef. Algérie.
- Terzaghi B. E and Sandine W. E., (1975).**, "Improved Medium for Lactic Streptococci and Their bacteriophages," Applied and Environmental Microbiology, Vol. 29, No. 6, pp. 807-813.
- Terzaghi B. E and Sandine W. E., (1991)** "Improved Medium for Lactic Streptococci and Their bacteriophages," Applied and Environmental Microbiology, Vol. 29, No. 6, 1975, pp. 807-813. Teuber, M., et Geis, A., 2006. The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. Prokaryotes. 4:205-228.
- Teuber, M., Geis, A., et Neve, H., (1995).** The genus *Lactococcus*. In Balows A, Truber HG, Dworkin, Harder MW et Schleifer KH (eds). The Prokaryotes. Vol II. 2nd. 1482- 1501 Springer- Verlag, New York, USA.
- Thomas T (1973).**, Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. NZ J Dairy Sci Tech 8:70-71.
- Thomas, L., et Dubeuf, J.P., (1995).** Les perspectives de développement de la filière lait de chèvre dans le bassin méditerranéen. Une réflexion collective appliquée au cas marocain. Journée professionnelles des 5, 6 et 7 octobre organisée au Maroc par le ministère de l'agriculture et de la mise en valeur agricole avec le concours de la FAO et du CIRVAL. Etude FAO production et santé animales.
- Thompson J., Gentry-Weeks C.R., (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loria, Uriage. 1 : 239-290.
- Tourette I. (2002).** Etude de l'influence des pratiques de traite et d'élevage sur la qualité sanitaire du lait de chamelle. Thèse de Doctorat en vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse. France.

Turner N., Sandine W. E., P. R. Elliker and Day E. A., (1963),“Use of Tetrazolium Dyes in an Agar Medium for Differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*,” Journal of Dairy Science, Vol. 46, No. 5, pp. 380-385.

Vadamode G.,Chirief J., Scorza O.C.(1981). An examination of minimal water activity for *S.aureus* ATCC6538Pgrowth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. Journal of food science.47.1259-1262.

Vandamme P.; Pot B.; Gillis M.; Devos P.; Kersters K. Et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407.

Vanos V and Cox L., (1986), “Rapid Routine Method for the Detection of Lactic Acid Bacteria among Competitive Flora,” Food Microbiology, Vol. 3, No. 3, pp. 223- 234.

Venzuela, A. S., ben Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R. L., Veljovic, K., canaméro, M.M., Topisirovic, M.k.L., et Galvéz, A. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food contr.20 :381-385.

Vignola C. L., Michel J. C., Paquin P., Moinneau M., Pouliot M Et Simpson R., (2002). Sciences et technologie du lait : Transformation du lait. Techniques et Documentation Lavoisier. 600 p.

Waes G., (1968),“The Enumeration of Aromabacteria in BD Starters,” Netherlands Milk and Dairy Journal, Vol. 22, pp. 29-39.

Wanjouhi M., Gitao C.G. et Bebora L., (2013), Subclinical mastitis affecting hygienic quality of marketed camel milk from North-Eastern Province, Kenya., Microbiology Research International Vol. 1(1), pp. 6-15.

Westerfeld W. W. (1945), A colorimetric détermination of blood actoin. Journal of biol. Chemistry 161, p. 495-502.

Wisselink H. W.; Weusthuis R. A.; Eggink G.; Hugenholtz J. Et Grobбен G. J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. International Dairy Journal 12, 151-161.

Yagil R. (1984). The adaptation of domesticated animals to arid zones with special reference to the camel. Refuah Veterinarith, vol. 41, n° 4: 144-156.

Yagil R. et Etzion Z. (1980). The effect of drought conditions on the quantity of camel’s milk. J. Dairy Sci., 47: 159-166.

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

Yateem A. ; Balba Mt.; Al-Surrayai T. ; Al-Mutairi B. Et Al-Daher. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk.International journal of dary science 3(4): 194-199.

Zahrn A.S., Al -Salah A.A. (1997). Isolation and identification of proteases producing psychrotrophic bacteria from raw camel milk, Austr. J. Dairy Techn., 52 (1) , 5-7.

Zamahoun, C.I.M.P.(2005). Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre nationale hospitalier Universitaire-Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.M.). Thèse de doctorat. Université de Mali.

Zanata P. et Basso A. (1992). A new approach of the characterization of *Streptococcus salivarius* subsp thermophilus based on acidificatio rates. Lait. 285-292.

Zarour K., Benmechernene Z., Hadadji M, Moussa Boudjemaa B. , Henni J., et Kihal M (2013).Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d’Algérie : « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques.

Ziane, M . (2008). Antibirésistance et transfert horizontaux de plasmide chez les bactéries lactiques indigènes. Mémoire de magistère, Université d’Oran, Algérie.

Zoumahoun, C.I.N.P. (2005) Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolée des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire –Hubert Koudougou Maga (C.N.H.U.H.K.M.).Thèse de doctorat, Université du Mali.

http://camelides.cirad.fr/fr/actualites/archives/dossier_mois13_15.html.

<http://almanach-dz.com/index.php?op=fiche&fiche=49>

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux de cultures

1. Milieu d'isolement

-Milieu M17 AGAR (Terzaghi et Sandine, 1975)

Ce milieu est recommandé pour la croissance des lactocoques.

Composant	g/l
Peptone trypsique de caséine	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Agar	15g
Eau distillée	950ml

pH= 7,2. Autoclavage 120°C pendant 20 mn.

-Milieu Elliker lactosé (Elliker, 1956).

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

pH= 7. Autoclavage 120°C pendant 20 min

2. Milieux d'identification

-Eau physiologie :

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

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

-Bouillon hypersalé :

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

Ph=7,2. Autoclavage 120°C peandant 20 min

-Milieu M16BCP (Thomas, 1973)

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

pH=6,5. Autoclavage 120°C pendant 20 min

-milieu KMK (Kempner Mc Kay, 1980)

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

pH=6,6. Autoclavage 120°C pendant 15min

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

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

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

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

-lait écrémé

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

Autoclavage 110°C pendant 10min

-lait de Sherman

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

pH=6,8

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

-milieu citrate de Simmons :

Composant	g/l
Sulfate de magnésium	0,2g
Phosphate de mono ammoniaque	1g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Bleu de bromothymol	0,08g
Phosphate bipotassique	1g
Agar	15g
Eau distillée	950ml

pH=6,8. Autoclavage 121°C pendant 15min

-Clark et Lubs

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

Ph=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

-milieu BEA

Composant	g/l
Peptone	17g
Peptone pepsique de viande	3g
Extrait de levure	5g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	1g
Bile de bœuf déshydratée	0,5g
Azide de sodium	10g
Chlorure de sodium	0,25g
Agar-agar	13g
Eau distillée	950ml

3. Milieu pour la qualité hygiénique

-milieu PCA (*Plate count agar*)

Composant	g/l
Tryptone	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Agar	15g

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20 min.

-milieu Champman

Composant	g/l
Peptone	10g
Extrait de viande e bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
Agar	15g

pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min.

-milieu VF (viande de foie)

Composant	g/l
Viande foie	30g
Glucose	2g
Agar	6g

pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20 min

Le milieu est coulé dans de longs tubes profonds et de faible diamètre. La base nutritive est riche et ne permet aucune sélection de genre. Le milieu doit être régénéré avant ensemencement pour obtenir un gradient de concentration en O₂ si l'on veut rechercher le type respiratoire de la bactérie

-milieu Mac conky

Composant	g/l
Peptone de caséine	17g
Peptone de viande	3g
Sels biliaires	1,5g
Cristal violet	0,001g
Lactose	10g
Rouge neutre	0,03g
NaCl	5g
Agar	13,5g

pH=7,1. Autoclavage 120°C pendant 20 min

-milieu Rothe

composant	g/l
Peptone	20g
Glucose	5g
Azide	0,2g
NaCl	5g
hydrogénophosphate de potassium	2,7g
dihydrogénophosphate de potassium	2,7g

pH=6,8. Autoclavage 120°C pendant 20 min

Ce milieu permet l'enrichissement en Entérocoques d'un inoculum de produit alimentaire. Un trouble signe la présence éventuelle de ces bactéries qu'il faudra ensuite confirmer par le test de Litsky, l'isolement et l'identification des colonies.

-milieu litsky

Composant	g/l
Peptone	20g
Glucose	5g
Azide	0,2g
Ethyl-violet	0,5g
NaCl	5g
Hdrogénophosphate de potassium	2,7g
dihydrogénophosphate	2,7g

pH=6,8. Autoclavage 120°C pendant 20 min

Ce milieu permet l'enrichissement en Entérocoques d'un inoculum de produit alimentaire. Un trouble dans le liquide signale la présence éventuelle de ces bactéries qu'il faudra ensuite confirmer par le test de Litsky, l'isolement et l'identification des colonies.

Il sert aussi au dénombrement des Streptocoques fécaux. C'est un test confirmatif qui se fait suite au test présomptif au milieu de Rothe.

La lecture des tubes se fait grâce au trouble apparaissant dans le liquide (auparavant transparent) et à l'éventuelle formation d'une pastille violette.

-milieu Lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)

Dénombrement des coliformes totaux (24 et 48 h à une température de 30 ou 37 °C), coliformes thermotolérants (24 et 48 h à une température de 44 °C), et d'*Escherichia coli* étape confirmative.

Composant	g/l
Peptone	10g
Lactose	10g
Bile	20ml
Vert brillant	13mg

pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20 min

-milieu SS :

Isolement des Salmonella et des Shigella mais aussi des Pseudomonas ou des Yersinia **enterocolitica**.

Composant	g/l
Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Lactose	10g
Citrate de sodium	10g
Citrate de fer	1g
Sels biliaires	8,5g
Vert brillant	3,3mg
Rouge neutre	25mg
Thiosulfate de sodium	8,5g
Agar	12g

Ph=7,3. NE pas autoclaver.

Annexe II : Tableau NPP de MAC GRADY

NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES							
Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)	Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)
10 g	1,0 g	0,1 g		10 g	1,0 g	0,1 g	
0	0	0	0	2	2	3	4,0
0	0	1	0,3	2	3	0	3,0
0	1	0	0,3	2	3	1	3,5
0	1	1	0,6	2	3	2	4,0
0	2	0	0,6	3	0	0	2,5
1	0	0	0,4	3	0	1	4,0
1	0	1	0,7	3	0	2	6,5
1	0	2	1,1	3	1	0	4,5
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	11,5
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,5
1	3	0	1,6	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	20,0
2	0	1	1,4	3	2	3	30,0
2	0	2	2,0	3	3	0	25,0
2	1	0	1,5	3	3	1	45,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	3,0	3	3	3	140,0
2	2	0	2,0				
2	2	1	3,0				
2	2	2	3,5				

Annexe III : réactifs et tampon

-Réactif VPI et VPII :

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

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

-Solution de phénolphthaline à 1% :

Phénolphthaline déshydraté 1g

Ethanol 95% 100 ml

-Tampon phosphate de sodium

Solution (a): 27,8 g NaH_2PO_4 dans 100ml d'eau distillée

Solution (b): 53,65g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée

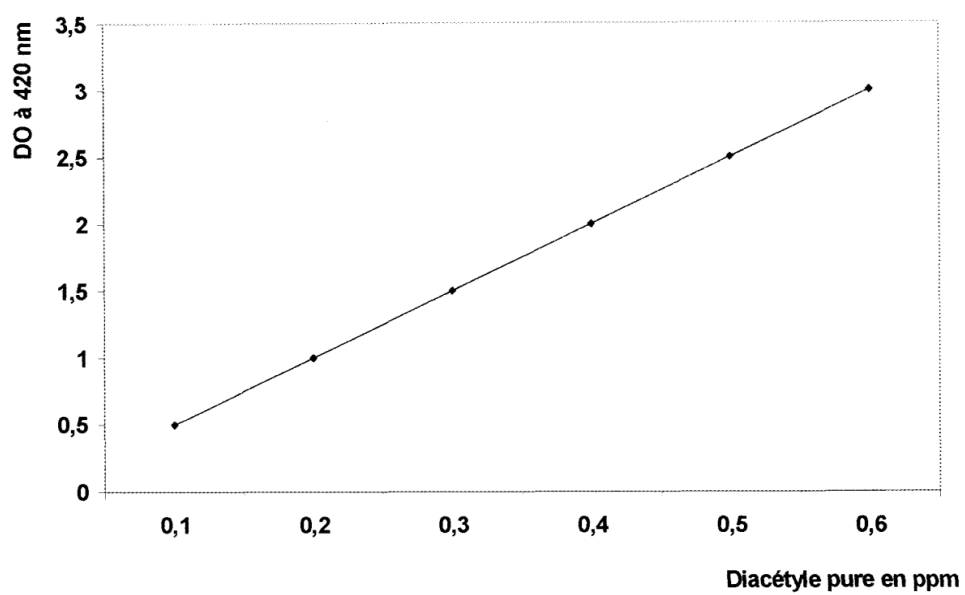
Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée

Stérilisation à 110° pendant 20min.

Annexe IV : Coloration de Gram

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

- * Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- * Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- * Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- * Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- * Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- * Laver à l'eau ;
- * Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).
Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe V : Gamme d'étalonnage (dosage du diacétyle)

Résumé

Le lait de chamelle présente un intérêt particulier pour toutes les populations, car il est parfaitement conforme aux exigences de l'homme vu sa haute teneur en nutriments de base. Le lait de chamelle peut être consommé cru, pasteurisé ou fermenté. Il peut être un vecteur de transmission de germes pathogènes à l'homme et peut présenter un risque pour la santé humaine. L'évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique du lait cru destiné à la consommation ou à la transformation est donc essentielle pour la protection du consommateur. La présente étude porte sur l'évaluation de la qualité microbiologique de sept échantillons du lait cru de chamelle, suivant les méthodes recommandées par la réglementation algérienne. Nos résultats montrent une charge en flore aérobie mésophile totale (FAMT) inférieure à 10^5 UFC/ml chez tous les sept échantillons. Nous avons enregistré un nombre entre 10^2 et 10^3 germes par 1 ml de lait cru de chamelle. Les échantillons du lait analysés présentent une charge en coliformes avec une valeur minimale de 0.3×10^2 UFC/ml et maximale de 2.5×10^2 UFC/ml par contre aucun résultat positif pour les coliformes fécaux. Absence des germes de streptocoques fécaux sauf le 2^{ème} échantillon qui avait un taux supérieur à la norme. Cette analyse mentionne que tous les échantillons sont dépourvus des germes pathogènes. Notre thème est consacré aussi à la recherche d'un milieu de culture spécifique pour le développement des espèces de *Lactococcus*. Différents milieux de culture, M17 Rifampicine, Elliker Rifampicine, M17- triméthoprim et Elliker –triméthoprim ont été testés sur 40 souches de *Lactococcus* isolées du lait cru de chamelle de différentes régions de l'Algérie. Après plusieurs essais, et études comparatives, le milieu Elliker triméthoprim a été retenu pour suivre l'isolement spécifique des espèces de *Lactococcus*. Les tests d'identification phénotypique, morphologiques, physiologiques, et biochimiques ont confirmé l'appartenance des 80 isolats aux espèces du genre *Lactococcus*. Ce milieu a permis l'isolement sélectif des espèces de *Lactococcus* suivantes : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus raffinolactis*. Les cinétiques de croissance, de pH, d'acidité Dornic, et de production d'acétoïne-diacétyl des souches MR08, MR32, MT45, MR10, MT56, MT63, MT28 dans le lait écrémé ont montré que nos souches produisent un taux élevé d'acide lactique au bout de 24 heures, avec une production de diacétyl très importante.

Mots-clés :

Milieu De Culture; Acétoïne-Diacétyl; Croissance; Lait De Chamelle; Cinétiques; *Lactococcus*; Qualité Sanitaire; Acidité Dornic; Germes.