



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET
DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Mémoire de Magister

*En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie
Option : Microbiologie appliquée*

THEME :

***EFFET DES BACTERIOCINES (TYPE NISINE)
PRODUITES PAR UNE SOUCHE LACTIQUE
ISOLEE A PARTIR DU FROMAGE CAMELIN, SUR
UNE SOUCHE PSYCHROTROPHE.***

Présenté et soutenu publiquement par : M^{elle} SOUID WAFA

Devant le jury:

Président	Mr ADAMOU A.	Maitre de conférences A (U.K.M.O)
Encadreur	Mme SIBOUKEUR O.	Maitre de conférences A (U.K.M.O)
Examineur	Mme OULD EL HADJ-KHELIL A.	Maitre de conférences A (U.K.M.O)
Examineur	Mr OULD EL HADJ M.D.	Professeur (U.K.M.O)
Invitée	Mme BOUDJENAH S.	Maitre -assistant A (U.K.M.O)

Année universitaire : 2010 / 2011

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser se travail dans de meilleurs conditions.

*Je tiens à remercier ma promotrice **M^{me} SIBOUKEUR Oum-el-kheir**, Maître de conférences A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, pour l'honneur qu'elle m'a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.*

*Je remercie infiniment ma Co-promotrice, **M^{me} BOUDJENAH Saliha**, Maître-assistant A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, pour avoir proposé ce thème, pour ses aides, ses conseils et sa disponibilité.*

*A **Mr ADAMOU A .**, Maître de conférences A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.*

*Je tiens à remercier profondément **M^{me} OULD EL HADJ-KHELIL Aminata**, Responsable de la Post-Graduation, Option Microbiologie appliquée, Maître de conférences A à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour son soutien morale inoubliable.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent à **M^r OULD EL HADJ Mohamed Didi**, professeur à l'université KASDI MERBAH d'Ouargla, de l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Au personnel des laboratoires pédagogiques, et du laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides pour leur aide et leurs conseils durant l'élaboration de l'expérimentation de ce mémoire.

*J'adresse ma reconnaissance à **M^r BENSACI Messaoud Bachagha** et **M^{elle} HASSAINE Amina** pour leur soutien et leur infinie gentillesse.*

Enfin, je remercie, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Ma très chère mère ;

La mémoire de mon père ;

Mes frères et sœurs ;

Toute ma famille ;

Tous mes chers amis.

Sommaire

Sommaire

	Pages
Introduction.....	1
I. Synthèse bibliographique.....	4
1.1. Présentation du lait de chamelle.....	4
1.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin.....	4
1.1.2. Composition biochimique du lait de chamelle.....	5
1.1.3. Propriétés antimicrobiennes du lait de chamelle.....	6
1.2. Conservation et transformation du lait de chamelle.....	9
1.2.1. Méthodes de conservation de lait de chamelle.....	9
1.2.1.1. Pasteurisation.....	9
1.2.1.2. Stérilisation.....	9
1.2.1.3. Thermisation.....	10
1.2.1.4. Réfrigération.....	10
1.2.1.5. Action du froid sur le lait.....	10
1.2.2. Flore psychrotrophe du lait.....	12
1.2.2.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
1.2.2.2. Impact des bactéries psychrotrophes dans le lait.....	14
1.2.3. Aptitude du lait de chamelle à la transformation en fromage.....	18
1.2.4. Bactéries lactiques et fabrication du fromage.....	20
1.2.4.1. <i>Lactococcus lactis</i>	20
1.2.4.2. Rôle de <i>Lactococcus lactis</i> dans la fabrication du fromage.....	21
1.3. Bactériocines.....	23
1.3.1. Bactériocines des bactéries lactiques.....	24
1.3.1.1. Classification des bactériocines des bactéries lactiques.....	24
1.3.1.2. Intérêts des bactériocines.....	25
1.3.2. Production et conditionnement des bactériocines.....	26
1.3.2.1. Production des bactériocines.....	26
1.3.2.2. Conditionnement des bactériocines.....	27
1.3.3. Mode d'utilisation des bactériocines.....	28
1.3.4. La nisine.....	28
1.3.4.1. Structure et propriétés physico-chimiques.....	28
1.3.4.2. Biosynthèse de la nisine	30

1.3.4.3. Spectre d'activité.....	31
1.3.4.4. Mode d'action.....	31
1.3.4.5. Toxicité de la nisine.....	33
1.3.4.6. Rôle de la nisine dans la conservation des aliments.....	33
1.3.4.7. Méthodes de détection et de quantification de la nisine.....	34
II. Matériel et méthodes.....	36
2.1. Matériel.....	36
2.1.1. Echantillons de lait de chamelle.....	36
2.1.2. Appareillage.....	36
2.1.2.1. Appareils utilisés pour les analyses physico-chimiques.....	36
2.1.2.2. Appareils utilisés pour la préparation du fromage.....	36
2.1.2.3. Appareils utilisés pour les manipulations microbiologiques.....	36
2.1.3. Verrerie et petit matériel.....	37
2.1.4. Réactifs.....	37
2.1.5. Milieux de culture.....	37
2.2. Méthodes.....	39
2.2.1. Analyses physico-chimiques.....	40
2.2.1.1. Mesure de l'acidité.....	40
2.2.1.2. Densité.....	40
2.2.2. Analyse microbiologique du lait	40
2.2.3. Isolement et identification De la souche productrice de nisine à partir d'un fromage frais camelin.....	41
2.2.3.1. Isolement.....	41
2.2.3.1.1. Essai de fabrication de fromage camelin frais.....	41
2.2.3.1.2. Technique d'isolement de la souche productrice de nisine.....	41
2.2.3.2. Identification biochimique de la souche <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	43
2.2.4. Production de nisine à partir de culture de <i>Lc.lactis ssp. Lactis</i>	46
2.2.5. Isolement et identification de l'espèce indicatrice.....	48
2.2.5.1. Isolement.....	48
2.2.5.2. Identification.....	48
2.2.6. Etude de l'activité inhibitrice de la nisine sur <i>Pseudomonas fluorescens</i>	49
2.2.6.1. Préparation de l'inoculum.....	49
2.2.6.2. Méthode des puits.....	50
2.2.6.3. Méthode des spots.....	50

2.2.6.4. Méthode des disques imprégnés.....	50
2.2.6.5. Mesure de l'activité antibactérienne en unité arbitraire (UA /ml).....	51
III. Résultats et discussion.....	52
3.1. Analyses physico-chimiques et microbiologiques.....	52
3.1.1. Analyses physico-chimiques.....	52
3.1.1.1. pH.....	52
3.1.1.2. Acidité.....	52
3.1.1.3. Densité.....	53
3.1.2. Qualité bactériologique de lait camelin.....	53
3.2. La fabrication du fromage camelin.....	54
3.3. Identification de la souche productrice de nisine isolée à partir Du fromage camelin.....	55
3.4. Identification de la souche indicatrice isolée à partir du lait camelin Réfrigéré.....	57
3.5. Production de la nisine et étude de l'activité antibactérienne de la nisine sur la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i>	61
Conclusion.....	66
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>ssp.</i>	Sous-espèce
UHT	Ultra Haute Température
ECD	Extrait coagulant gastrique de dromadaires
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
BL	Bactéries lactique
Sp.	espèce
<i>Nis.</i>	nisine
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
BN	bouillon nutritif
GNO	Gélose nutritif ordinaire
SCN	Surnageant de culture neutralisée
Zi	Zone d'inhibition

Liste des figures

N°	intitulé	page
1	Evolution de la flore bactérienne d'un lait réfrigéré (D' après AUCLAIR, 1979)	13
2	Structure de quelques bactériocines des bactéries lactiques (les lantibiotiques)	27
3	Structure de la nisine A et de la nisine Z (Mc AULIFFE <i>et al</i> , 2001).	30
4	Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine (SAHL <i>et al</i> , 1998).	33
5	Procédure expérimentale	40
6	Etapas de fabrication du fromage camelin frais	43
7	Production de nisine à partir d'une culture de <i>Lc.lactis ssp.lactis</i>	48

Liste des photos

N°	intitulé	page
1	Culture bactérienne sur milieu M17	56
2	Identification par la galerie biochimique API 20 E (<i>Lc.</i>)	57
3	Culture bactérienne sur milieu GNO	59
4	Identification par la galerie biochimique API 20 E (<i>Ps.</i>)	61
5	Culture bactérienne sur King A	62
6	Culture bactérienne sur King B	62
7	Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis <i>Ps. fluorescens</i> par la méthode des spots	63
8	Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis <i>Ps. fluorescens</i> par la méthode des disques	63
9	Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis <i>Ps. Fluorescens</i> par la méthode des puits.	63

Liste des tableaux

N°	intitulé	page
I	Composition biochimique globale (%) du lait de chamelle (d'après MIETTON <i>et al.</i> (1994) cité par BENGANA, 2001).	8
II	Classification des microorganismes en fonction de leur température de développement	12
III	Caractéristiques des principaux genres de <i>Pseudomonas</i> (selon GUIRAUD, 2003)	16
IV	Activités métaboliques et dégradations d'origine microbienne dans les produits laitiers (CAROLE, 2002)	18
V	Caractéristiques des genres <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i> (GUIRAUD, 2003)	23
VI	Classification des bactériocines des bactéries lactiques (HENG et TAGG, 2006)	26
VII	Grille d'appréciation de la qualité microbienne du lait (BERRENS et LUQUET, 1987).	42
VIII	Analyses physico-chimiques du lait camelin	53
IX	Examens, microscopique et macroscopique, de la souche isolée	56
X	Identification de la souche isolée par les tests biochimiques et physiologiques	58
XI	Examens préliminaires de la souche	59
XII	Identification de la souche indicatrice par les tests biochimiques et physiologiques	61
XIII	Mesure du diamètre moyen des zones d'inhibition (Zi) pour la technique des puits et des disques	64

Résumé

La présente étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet antagoniste d'une souche lactique bactériocinogène d'origine cameline contre une souche psychrotrophe contaminante du lait.

La souche lactique productrice de bactériocines (type nisine) est isolée à partir d'un fromage camelin frais préparé au laboratoire avec un rendement non négligeable, égale à 35,5 %. La souche indicatrice est une souche psychrotrophe isolée à partir d'un échantillon de lait de chamelle cru, stocké à 4°C pendant plus de 3 jours. Ainsi, le surnageant neutralisé d'une culture de *Lactococcus lactis ssp .lactis*, sur milieu M17 (8000 g/ 20 min à 4°C) a été testé contre la souche de *Pseudomonas fluorescens* selon les trois techniques de diffusion sur gel ; les spots, les puits et les disques. Le surnageant neutralisé a montré une activité antibactérienne qui s'est manifesté par l'apparition de zones d'inhibition dont le diamètre diffère selon la nature du test utilisé. Des diamètres variant entre 9 et 18 mm et entre 12 et 29 mm ont été enregistrés respectivement avec les puits et les disques. La technique des spots a donné des résultats moins concluants.

Mots clés : lait, chamelle, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactococcus lactis ssp .lactis*, fromage, nisine.

ABSTRACT

This study aims to highlight in the antagonistic effect of a lactic strain bacteriocins producer against a psychrotrophic strain milk contaminant.

The lactic strain producing bacteriocins (nisin type) was isolated from a fresh camel cheese, which was prepared on laboratory .his yield is not negligible, equal to 35, 5 %.The indicator strain is a psychrotrophic strain isolated from a raw camel milk sample ,stocked at 4°C during more than 3 days. Thus, neutralized cell-free supernatant of *Lactococcus lactis ssp .lactis* growth in M17 medium (8000 g /20 min à 4°C) was tested against the strain *Pseudomonas fluorescens* using three techniques of gel diffusion method; the spots, the wells and disks technique. The neutralized cell-free supernatant pointed at antibacterial activity, which manifested by appearance of inhibition zones .the inhibition zones diameter differ according to the used test nature. Diameters varied between 9 and 18 mm and between 12 and 29 mm, registered respectively with wells technique and disks technique. The spots technique gave less conclusive results.

Key words: milk, camel, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactococcus lactis ssp .lactis*, cheese, nisin.

المخلص

هذا العمل يقوم بتسليط الضوء على التضاد بين البكتيريا اللبنية المنتجة النيزين والبكتيريا المحبة للبرودة الملوثة للحليب. البكتيريا المنتجة النيزين تم عزلها من جبن طازج معد في المخبر من حليب الناقة الطازج ، حيث بلغ مردوده 35,5 % . البكتيريا المختبرة المحبة للبرودة *Pseudomonas fluorescens* تم عزلها من عينة من حليب الناقة الطازج المحفوظ في درجة حرارة 4 م° لمدة تفوق 3 أيام . كما أن المستخلص المعدل المتحصل عليه من مزرعة *Lactococcus lactis ssp. lactis* في وسط M17، وذلك بعد إجراء عملية الطرد المركزي (8000 g/ 20 min à 4°C)، حيث يختبر هذا المستخلص ضد *Pseudomonas fluorescens* بواسطة ثلاث تقنيات للانتشار في الهلام (الجيلوز) و هي : طريقة البقع، الحفر و الأطباق. المعدل يبين فعالية ضد البكتيريا المستعملة وذلك يتضح من خلال ظهور مناطق كبح النمو في مزرعة البكتيريا المختبرة ، حيث تختلف هذه الأقطار حسب الاختبار المستعمل. تم تسجيل الأقطار من 9 إلى 18 مم ومن 12 إلى 29 مم تواليا بواسطة اختباري الحفر و الأطباق، فيما طريقة البقع فتعطي نتائج غير واضحة.

الكلمات المفتاحية : حليب، ناقة، *Pseudomonas fluorescens*، *Lactococcus lactis ssp. lactis*، جبن، نيزين.

Introduction

Introduction

Le lait est un fluide biologique complexe, sécrété par les mammifères (**RASOLOFO, 2010**). Il constitue un aliment important dans l'alimentation quotidienne de l'homme vu sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, lipides et glucides), sa richesse en calcium et son apport non négligeable en vitamines (A, B2, B5 et B12) et en divers sels minéraux (**OUALI, 2003**).

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**). L'activité antimicrobienne du lait de chamelle est supérieure à celle du lait de référence (**EL-AGAMY et al., 1992**). Cette activité est due à la présence de teneurs assez importantes en facteurs antimicrobiens tels que la lactoferrine, le lysozyme, des immunoglobulines comparables à celles de l'être humain... Le lait camelin possède par ailleurs, certaines propriétés thérapeutiques. Il renferme des teneurs assez intéressantes en insuline (**AGRAWAL et al., 2004**). Il ne contient pas de β -lactoglobuline, protéine lactosérique représentant le principal allergène chez le nourrisson. Il est ainsi utilisé contre la tuberculose, le diabète juvénile (**BEG et al., 1985**), la constipation, l'asthme... (**YAGIL, 1987**) et peut être consommé par les personnes immunodéficientes (**AGRAWAL et al., 2004**).

La transformation du lait camelin est réputée difficile, notamment la fabrication fromagère et beurrière. Des technologies modernes de transformation fromagère du lait de chamelle ont été testées dans différents pays (Mauritanie, Tunisie, Arabie Saoudite, Jordanie) (**FAYE, 1997**). Des mises au point de nouvelles techniques permettant de coaguler le lait de chamelle, offrira aux éleveurs camelins une opportunité intéressante de valoriser les excédents laitiers d'hivernage sous forme de fromage (**FAYE, 1998**).

L'aptitude d'un lait à la transformation fromagère est étroitement liée à la nature de ses constituants (**GOURSAUD, 1985**). L'inaptitude à la coagulation, due essentiellement à la composition particulière des micelles de caséines et à leur dimensions dont le diamètre moyen est environ le double (300 μm) de celui du lait de vache (160 μm), représente l'une des contraintes rencontrées lors de la transformation du lait camelin en fromage (**FARAH et BACHMAN, 1987**;

JARDALI, 1988; FARAH et RUEGG, 1989; JARDALI ET RAMET, 1991). De plus, comparé au lait de la vache, le lait de chamelle est pauvre en κ caséine, protéine responsable de la consistance du coagulum. Son équilibre minéral, particulier, amplifie son inaptitude à la coagulation (**KAMOUN, 1995**). **KAMOUN et RAMET (1989)**, ont montré la possibilité de transformer ce lait en fromage présentant une conservabilité satisfaisante à condition de tenir compte des particularités inhérentes à sa composition physico- chimique. Plus récemment, des travaux entrepris au niveau de l'université de Ouargla, ont montré que la substitution des enzymes habituellement utilisées en fromagerie (présure commerciale), par des protéases gastriques issues de caillettes de dromadaires adultes (âgés de 8 à 9 ans) permet d'améliorer l'aptitude du lait camelin à la coagulation (**SIBOUKEUR et al., 2005**).

D'autre part, lors de la réfrigération du lait, des germes psychrotrophes sont susceptibles de produire des enzymes lipolytiques et protéolytiques, à l'origine de mauvais goûts dans les fromages (des goûts amers, des saveurs non désirées et atypiques ...) (**LE JAOUEN, 1993**). Il s'agit de micro-organismes présents dans le lait cru, ayant une aptitude à se développer à basse température (8-4°C). Parmi cette flore, figure le genre *Pseudomonas* et plus particulièrement l'espèce *Pseudomonas fluorescens* qui synthétise des protéases et des lipases exocellulaires thermostables (**LAW, 1979**). Plusieurs auteurs ont rapporté les impacts de ces enzymes dans le lait et les produits laitiers (**FAIRBAIM et LAW, 1986 ; DEETH et al., 2002 ; NIELSEN, 2002**). **PAQUET et al. (1987)** ont rapporté que la production des protéases est corrélée avec la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans les laits entreposés à 6 °C pendant trois jours. La protéolyse des caséines augmente à mesure que la concentration de *Ps. fluorescens* augmente dans le lait (**RASOLOFO, 2010**). La protéolyse est parfois à l'origine d'un défaut de saveur : l'amertume. Ce défaut résulte de l'accumulation de peptides de petite taille, ayant une hydrophobicité élevée et dont la partie C terminale est constituée soit d'un résidu leucine, phénylalanine ou tyrosine (**BROADBENT et al., 2002**). Les lipases d'origines microbiennes permettent de transformer les triglycérides en glycérides partiels (mono et diglycérides) et en acides gras (**CHOISY et al., 1984**). A des températures inférieures à 10°C, la flore lactique du lait n'étant plus dominante, d'autres micro-organismes considérés comme nuisibles en fromagerie tels que les psychrotrophes deviennent dominants (**LE JAOUEN, 1993**). La flore lactique est un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elle colonise de nombreux produits alimentaires comme le lait et ses produits (**DORTU et THONART, 2008**). L'intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire réside principalement dans leur capacité à transformer certains sucres en lactate et ainsi qu'à acidifier le milieu environnant. Il s'agit d'une caractéristique utilisée dans de nombreux procédés de

transformation dont la fabrication fromagère (**RAYNAUD, 2006**). D'autre part, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les **bactériocines**. Ces dernières sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries d'altération ou pathogènes (**DORTU et THONART, 2008**).

Les bactériocines représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes (**DORTU et THONART, 2009**). En agro-alimentaire seule la nisine issue de *Lactococcus lactis* est autorisée comme additif alimentaire (E 234) depuis 1969 (OMS). Selon la Generally Recognized As Safe (GRAS), la nisine possèderai un large spectre d'activité antibactérienne, essentiellement dirigé contre les bactéries à GRAM positives. En 1951, la nisine fut préconisée par HIRSCH afin d'éviter le gonflement de fromages à pâte pressée cuite par *Clostridium tyrobuturicum*, elle fut également utilisée dans la conservation de fromages fondus (**MCCLINTOCK, 1952**), pour réduire ou même supprimer l'emploi de conservateurs chimiques, comme les nitrites. La nisine est efficace contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobuturicum* (**KALCHAYANAND et al., 2008**). Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ* (**DORTU et THONART, 2009**).

La présente étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet antagoniste d'une souche lactique bactériocinogène contre une souche psychrotrophe contaminante du lait. Elle comporte 4 étapes essentielles:

- Isolement et identification d'une souche de *Lactococcus lactis ssp. lactis* à partir d'un fromage frais fabriqué à partir de lait de chamelle : souche productrice de nisine.
- Isolement et identification de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* à partir du lait de chamelle conservé à 4°C pendant 10 jours : bactérie cible de la nisine.
- Culture de la souche lactique en vue de produire la nisine.
- Etude de l'activité antibactérienne de la substance produite par *Lactococcus lactis ssp. lactis* contre la souche cible *Ps. Fluorescens*.

I. Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1.1. Présentation du lait de chamelle

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (**BOURGEOIS et LARPENT**, 1996). Le lait camelin a un rôle important pour la nutrition humaine dans les zones arides et semi-arides. Il renferme tous les nutriments essentiels qu'on trouve dans le lait bovin, en quantités équilibrées (**EL-AGAMY, ABOU-SHLOUE et ABDEL-KADER**, 1998; **KARUE**, 1998).

1.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du lait camelin

Du point de vue physico- chimique, le lait est un produit très complexe. Les principales propriétés physico-chimiques qui intéressent l'industrie laitière sont la densité, le point de congélation, l'acidité et le pH (**VIGNOLA et al**, 2002).

Le lait camelin, est généralement blanc et opaque, avec un goût agréable (**DILANYAN, 1959; KHERASKOV, 1953; YAGIL & ETZION, 1980**). Ce lait a un goût légèrement sucré, parfois piquant ou amer ou salé, selon la nature des plantes du désert ingérées par l'animal (**RAO, GUPTA et DASTUR, 1970 ; KHASKHELI et al, 2005**). Le changement du goût peut également être dû à la disponibilité de l'eau buvable (**FARAH, 1996**). Il peut se présenter sous forme crémeux qu'on le légèrement agité (**SHALASH, 1979**). La densité moyenne du lait camelin égale à 1.029 (**FARAH, 1996**), le rend moins visqueux que le lait bovin (**LALEYE, JOBE et WASESA, 2008**). Selon **SIBOUKEUR (2007)**, sa densité à 15° C oscille entre 0,99 et 1,034, contre 1,028 à 1,035 pour le lait bovin. Sa viscosité moyenne est égale à 2,2 centipoises.

Le pH du lait camelin frais se situe entre 6,5 et 6,7 (**KHASKHELI et al, 2005; MEHAIA, et al, 1979**); un léger abaissement du pH à 6,4 (**ABU-TARABOUSH et al. 1998; YAGIL, SARAN, & ETZION, 1984**) et 6,0 est aussi enregistré (**EL-HADI SULIEMAN et al, 2006**). Le pH du lait camelin est similaire à celui du lait de brebis (**YAGIL et al, 1984**), mais un peu acide par rapport à celui du lait bovin, ce dernier se situe entre 6,6 et 6,8 (**SAWAYA et al, 1984**).

Selon **MOHAMED et al. (1995)**, **WANGOH et al. (1998)** et **SMAIL (2002)**, le point de congélation du lait camelin se situe entre -0,543 et -0,565. Cette valeur est susceptible de variation selon la teneur en différents composants du lait. L'acidité Dornic du lait dépend du nombre de moles d'acides présents et est inversement proportionnelle à son pH (**MATHIEU ,1998**). Les valeurs de l'acidité titrable exprimée en degré Dornic, du lait camelin varient d'un auteur à

l'autre. Elle est de l'ordre de 15,6°D selon **KAMOUN** (1995) ; **BADAOU**, (2000) et égale à 16±0,91 selon **GUERRADI** (1998).

1.1.2. Composition biochimique du lait de chamelle

La composition du lait camelin a été considérée comme la moins stable comparée à celle des laits des autres espèces, bovine en l'occurrence. La variation de la composition du lait camelin peut être attribuée à plusieurs facteurs, comme la localisation géographique, les conditions alimentaires, la race, le stade et le rang de lactation (**KHASKHELI et al**, 2005). Le tableau ci-dessous (tableau I) illustre la composition biochimique globale du lait de chamelle selon différents auteurs en comparaison avec celle du lait bovin.

D'après le tableau, le lait de chamelle est presque similaire au lait bovin de par sa composition en eau, en lactose, en protéines et en matière sèche totale. Cependant, il est moins riche en matière grasse que le lait de vache. Ce résultat est aussi signalé par **CHILLIARD** en (1989) et **FAYE** en (1997). Les globules gras des lipides sont de très petite taille, ce qui les rend très digestes (**CHILLIARD**, 1989). Ils restent en suspension même après 24h au repos, contrairement au lait de vache par exemple dans lequel ils constituent une couche grasse en surface au bout de quelques heures. Par ailleurs, la matière grasse du lait de chamelle est liée aux protéines. Tout ceci explique la difficulté à baratter le lait de chamelle pour en extraire le beurre (**FAYE**, 1997). Les lipides du lait de dromadaire ne contiennent presque pas d'acides gras à chaîne courte, contrairement à ce qui est observé chez les ruminants (vache, chèvre, brebis, antilope...). Il est par contre riche en acides gras insaturés (surtout linoléique et palmitoleïque) et en acides gras essentiels, ce qui permet de souligner encore son intérêt nutritionnel pour le chamelon et le nomade (**CHILLIARD**, 1989).

Comparé au lait de la vache, Le lait de chamelle est pauvre en caséines, protéines responsables de la consistance du lait coagulé, et son équilibre minéral particulier, amplifie son inaptitude à la coagulation (**KAMOUN**, 1995).

Les caséines (CN) constituent la fraction protéinique majeure du lait. Elle varie entre 52 et 87 % des protéines totales du lait de chamelle (**FARAG & KABARY**, 1992; **KHASKHELI et al**, 2005; **MEHAIA et al**, 1995). Une particularité des caséines camelines est qu'elles sont distribuées sous forme de micelles ayant un diamètre double de celui des micelles bovines (**FARAH et BACHMAN** ,1987 ; **JARDALI** ,1988. **FARAH et RUEGG** ,1989 ; **JARDALI et RAMET**, 1991).

Les acides aminés du lait camelin sont comparables à celles du lait bovin. Cependant, la glycine et la cystéine qui sont significativement, moins fréquente dans la composition des caséines camelines (**FARAH & RÜEGG, 1989**).

Les protéines lactosériques camelines, solubles à pH 4.3, se caractérisent par l'absence de la β -lactoglobulines, comme dans le cas du lait humain (**EL-AGAMY et al, 2009**). Le sérum du lait camelin contient aussi d'autres composants importants tels que les immunoglobulines, le sérum albumine, la lactoferrine, la lactopéroxydase, l' α lactalbumine le composant 3 des protéose-peptones... (**FARAH, 1993; KAPPELER, HEUBERGER, FARAH et PUHAN, 2004; MERIN et al, 2001**).

Une richesse exceptionnelle en vitamine C (au moins 3 fois plus que dans le lait de vache) et niacine (B3) caractérise ce lait. Il est également riche en thiamine, riboflavine, acide pantothénique et vitamine B6. Il contient aussi un taux appréciable de vitamines B12 et A (**SAWAYA et al, 1984 ; FAYE, 1997 ; MOHAMED, 1999 ; FARAH et al, 1992; STAHL et al, 2006 ; HADDADIN et al, 2008**).

Les principaux constituants minéraux du lait camelin sont le calcium, le phosphore, le sodium, le potassium, le magnésium et le fer. Cependant en cas d'intoxication, des éléments traces tels que le plomb, le nickel ou le chrome peuvent être retrouvés dans le lait (**FAYE, 1997**). La composition en minéraux du lait de chamelle est plus diversifiée que celle de lait de vache. Si les taux en macro- éléments (Na, K, Ca, Mg...) sont pratiquement similaires dans les deux laits, cela n'est pas le cas des oligo-éléments où les teneurs en Fe, Cu, Mn, Pb et I, y sont particulièrement élevées dans le lait d'origine cameline (**SMAIL, 2002 ; MOUSSA, 2003**).

1.1.3. Propriétés antimicrobiennes du lait de chamelle

Le lait de chamelle posséderait un effet antimicrobien contre les bactéries GRAM positive et GRAM négative, parmi ces bactéries on trouve *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* (**BENKERROUM, MEKKAOU, BENNANI, & KAMAL, 2004; EL- AGAMY et al, 1992**). Cette activité est attribuée à la présence dans le lait de chamelle de substances antimicrobiennes telles que le lysozyme, le peroxyde d'hydrogène, la lactoferrine, la Lactoperoxydase et les immunoglobulines (**EL-AGAMY et al, 1992**). L'activité antimicrobienne du lait de chamelle est en moyenne supérieure à celle du lait de la vache (**FAYE, 1997**). La quantité de lysozyme, lactoferrine et

immunoglobulines dans ce lait est supérieure à celle de lait bovin (**BENKERROUM, 2008; EL-AGAMY, 2000; KAPPELER *et al*, 1999; KONUSPAYEVA *et al*, 2007**). Le lysozyme ou muramidase, de masse moléculaire estimée en électrophorèse à 14400 Da (**EL-AGAMY *et al*, 1996**), est thermostable, et hydrolyse les liaisons glycosidiques particulières de la paroi des bactéries. Cette enzyme a un effet bactériolytique puissant (**ANONYME 1,1995**).

Tableau I : Composition biochimique globale (%) du lait de chamelle (d'après MIETTON *et al*. (1994) cité par BENGANA, 2001).

Espèce	Références bibliographiques	Constituant				
		Eau	Matière sèche totale	Lactose	Matière grasse	Protéines
Chamelle	YAGIL <i>et</i> ETIZON ,1980	88.28	11.72	3.81	2.83	3.82
	SAWAYA <i>et al</i>, 1984	88.10	11.90	4.40	3.60	2.95
	ABDERAHIM, 1987	87.40	13.4	4.80	3.20	4.00
	MEHAIA <i>et al</i> ,1988	91.25	8.75	4.51	1.00	3.24
	FARAH <i>et</i> RUEGG, 1989	87.80	12.20	5.24	3.15	3.11
	ELAMIN <i>et</i> WILCOX ,1992	88.33	10.95	4.16	3.15	2.81
	ABU LEHIA ,1994	87.85	12.15	4.95	3.20	3.20
	KAMOUN ,1994	88.22	11.87	4.78	3.66	3.34
	WINGOH <i>et al</i> ,1994	87.15	12.85	4.17	4.43	3.17
	MEHAIA <i>et al</i>, 1995	89.32	10.68	4.44	2.84	2.60
Vache	MIETTON <i>et al</i>, 1994	87.00 - 87.50	12.5-13.0	4.80-5.00	3.40-4.40	2.90- 3.50

La lactoferrine est une glycoprotéine de masse moléculaire égale à environ 78000 Da. Elle peut fixer le fer, et joue un rôle primordial dans l'absorption intestinale du fer chez le nourrisson. Cette glycoprotéine possède une activité bactériostatique, en captant le fer nécessaire au développement des microorganismes (**MONARD *et* VERNERT, 1988 ; HURLEY *et al* .,1993**).

La lactopéroxydase de masse moléculaire estimée à 78000 Da (**EL AGAMY *et al*, 1996**) est une enzyme qui résiste au suc gastrique et tolère des pH acides. Elle est relativement thermostable, entraîne des lésions dans la membrane cytoplasmique des bactéries, causant des fuites d'ion potassium, d'acides aminés et de polypeptides cellulaires, de plus les systèmes de transport cellulaires sont inhibés, ainsi que la synthèse des acides nucléiques ou des protéines (**HASLAY et LECLERC , 1993**). Cette enzyme joue un rôle bactéricide en catalysant l'oxydation par l' H_2O_2 , de l'ion SCN^- provenant du catabolisme des acides aminés soufrés. L'ion OSCN^- produit semble inactiver certaines bactéries sensibles (**RIBADEAU et DUMAS, 1991**). Elle présente une activité bactériostatique contre les bactéries à GRAM positif et bactéricides contre les GRAM négatif (**EL AGAMY *et al*, 1992**).

D'autre part, les bactériocines, parmi lesquelles la nisine produite par les lactocoques, sont des protéines douées d'une activité bactéricide importante. Elles ont un effet inhibiteur sur la majorité des germes pathogènes à GRAM positif (**DE ROISSART et LUQUET, 1994**).

D'autre glycoprotéines de poids moléculaire élevé, les immunoglobulines, présentes dans les laits de toutes les espèces et ayant pour la plupart une origine sanguine (**DEWIT, 1998**), protègent le lait et le nourrisson contre les attaques microbiennes (**LYDYARD *et al.*, 2002**).

Le peroxyde d'hydrogène a un effet toxique sur les bactéries pathogènes. Il est présent dans le lait camelin et a un effet toxique sur les bactéries pathogènes. Il est présent dans le lait camelin à une concentration de 10 m mole /l, il active le système (Lactopéroxydase Thiocyanate Peroxyde d'hydrogène ou système LSP).

Une autre protéine douée d'une activité antimicrobienne, le composant 3- des protéose-peptones (PP3). Ce composant présente deux variants génétiques A et B qui ont respectivement 137 et 122 résidus d'acides aminés et des PM estimés respectivement à 15 442 et 13 661 Da. Il se trouverait au niveau du lait camelin à une teneur nettement plus élevée que celle rencontrée pour le PP3 bovin (**KAPPELER *et al*, 1999**). Le composant 3- des protéose-peptones (PP3) a un effet inhibiteur et sélectif contre les halophiles qui peut s'expliquer par le fait que ces bactéries se développent dans le milieu hypersalé, le lait camelin de par sa composition et son goût souvent salé semble présenter un milieu favorable au développement de ce groupe bactérien (**KOUNIBA, 2002**).

1.2. Conservation et transformation du lait de chamelle

1.2.1. Méthodes de conservation de lait de chamelle

Le lait est un bon milieu de croissance pour les microorganismes en raison de sa teneur en eau

élevée, de son pH proche de la neutralité et de sa composition équilibrée en nutriments de base (**RASOLOFO, 2010**). Un des soucis constants de l'homme a été de tenter de différer dans le temps la consommation de ce lait en appliquant pour cela divers procédés de conservation (**RAMET, 1985**).

1.2.1.1. Pasteurisation

La pasteurisation est le traitement thermique qui présente l'avantage de détruire la totalité des germes pathogènes susceptibles de se trouver dans le lait et de réduire sa flore banale. Pour cela, des barèmes appropriés (température / temps de chauffage) ont été proposés :

- Pasteurisation basse 63 °C pendant 30 minutes ;
- Pasteurisation haute (HTST) 72°C pendant 20 secondes (**LUQUET et BOURDIER, 1991**).

Si le procédé de pasteurisation est correctement appliqué, le lait sera exempt de bactéries psychrotrophes à Gram négatif et de bactéries pathogènes principalement observées dans le lait cru (**RAY, 1996**).

Seules les bactéries pathogènes sont détruites par la pasteurisation du lait, mais les toxines sont très résistantes aux traitements thermiques usuels. La pasteurisation ne permet donc pas d'éliminer le risque d'intoxication. Les produits au lait cru et ceux pasteurisés restent sur un pied d'égalité vis à vis du danger lié aux toxines staphylococciques (**LARPENT, 1996**).

Le traitement thermique le plus utilisé dans le cas de lait de chamelle est la pasteurisation (**CHAIBOU, 2005**).

1.2.1.2. Stérilisation

La Stérilisation (120 à 140 °C pendant quelques secondes pour le lait et plus de 30 min pour les conserves) vise à détruire toutes les bactéries et surtout les formes résistantes (spores). Le produit est stable est conservable à température ambiante (**SEBTI, 2000**).

Pour la stérilisation commerciale du lait (UHT) où la température peut atteindre jusqu'à 150°C, on vise la réduction des thermophiles dans le lait et même les formes sporulées. Cependant, dans certains cas Le lait UHT, qui est un produit commercialement stérile, peut contenir des spores viables de quelques bactéries thermoduriques (**RAY, 1996**).

1.2.1.3. Thermisation

La thermisation (traitement qui a lieu à 64°C pendant 15 à 20 secondes) est surtout utilisée pour détruire les bactéries psychrotrophes, qui se développent dans un lait ayant subi, soit une

réfrigération à la ferme, soit un stockage réfrigéré au niveau de la fromagerie. Ces bactéries surtout les espèces des genres : *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Flavobacterium* produisent des lipases et des protéases exocellulaires résistantes à la pasteurisation (72-74°C, 15-20 sec) et même à la stérilisation UHT (132°C, 1-2 sec) (**LENOIR et al**, 1983). La thermisation a aussi effet sur les bactéries pathogènes et les bactéries mésophiles, comme elle peut diminuer la charge globale en bactéries (**SEBTI**, 2000).

1.2.1.4. Réfrigération

La conservation à basse température réduit la croissance et l'activité des bactéries à l'origine de la dégradation et prolonge la durée de conservation du lait. La conservation à des températures en dessous du minimum de croissance entraîne une prolongation continue de la phase de latence jusqu'à ce que la multiplication cesse et la croissance du microorganisme s'arrête (**DOYLE et al**, 1997).

D'autre part, aux températures comprises entre 0 et 10°C des changements mineurs dans les conditions physico-chimiques ont de grands effets sur la croissance bactérienne (**KORKEALA et al**, 1989). Toutefois la réfrigération ne tue pas ou n'élimine pas une contamination microbienne. Elle permet de la croissance, le développement aux seuls microorganismes psychrophiles capables de croître sur le lait à des températures en dessous de 7°C (**ASHIE et al**, 1996). La réfrigération du lait dès la ferme et son stockage pendant un temps plus ou moins long sélectionne des bactéries psychrotrophes qui peuvent devenir alors une flore dominante. Parmi ces bactéries le genre *Pseudomonas* est le plus fréquent (**MIRANDA et GRIPON**, 1986).

1.2.1.5. Action du froid sur le lait

Le lait recueilli après la traite contient toujours des microorganismes dont le nombre et les espèces auxquels ils appartiennent sont très variables. La présence inévitable de ces germes est due à des contaminations d'origine intra-mammaire et extra-mammaire qu'il est nécessaire de limiter le plus possible en raison du rôle néfaste qu'elles peuvent avoir sur la conservation du lait et sur la qualité et le rendement des produits fabriqués.

On connaît depuis longtemps l'influence considérable de la température sur le développement et l'activité des microorganismes et, en conséquence, son action utile ou nuisible sur la conservation des aliments. En fonction des limites de température entre lesquelles prolifèrent les microorganismes, on en distingue trois groupes (Tableau II) :

Tableau II : Classification des microorganismes en fonction de leur température de développement

Microorganismes	Température de développement en °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	- 5	+ 5 à + 10	+ 20
Mésophiles	+ 10	+ 30 à + 40	+ 45
Thermophiles	+ 40	+ 50 à + 60	+ 75

Le maintien du lait au froid a essentiellement pour but d'arrêter le développement des microorganismes. Il constitue un traitement de stabilisation. Il ne peut ni améliorer la qualité initiale du lait ni entraîner la mort des bactéries. Dans les limites courantes de température auxquelles, en pratique, le lait peut être soumis (entre 40°C et 3°C), on observe que la prolifération microbienne diminue avec l'abaissement de la température, ainsi que le montre la figure 01.

1.2.2. Flore psychrotrophe du lait

Les psychrotrophes sont les micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à + 7°C (ROZIER ,1995 ; CATTEAU ,1999). D'après cette définition, les bactéries psychrophiles appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles.

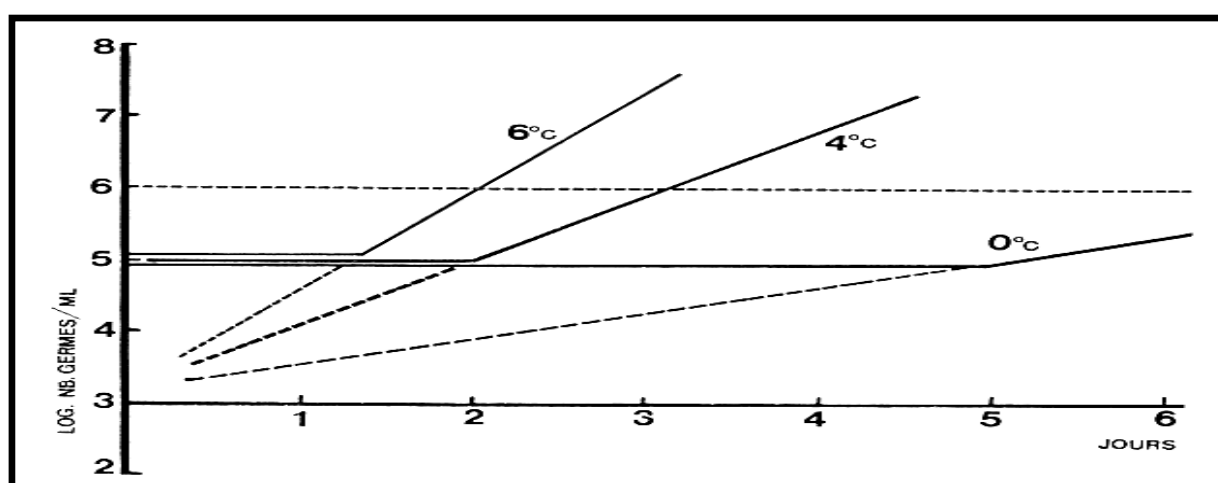


Figure 1: Evolution de la flore bactérienne d'un lait réfrigéré (D'après AUCLAIR, 1979).

Il faut noter que le monde des micro-organismes psychrotrophes ne se limite pas aux seules bactéries, on rencontre aussi un nombre très important d'espèce de micromycètes, agents de l'altération au froid, des denrées alimentaires.

Les bactéries psychrotrophes du lait cru sont essentiellement des bactéries GRAM négatif, se multipliant à une température inférieure à 7°C et dont le genre le plus représentatif est *Pseudomonas* (LAW, 1979).

Les bactéries psychrotrophes détectées dans le lait peuvent être des bactéries à GRAM négatif ou à GRAM positif. Les bactéries à GRAM négatif sont les principaux psychrotrophes dans le lait cru. Les *Pseudomonas* y représentent 51% des bactéries psychrotrophes (REINHEIMER *et al*, 1990). Les autres bactéries à GRAM négatif rencontrées dans le lait appartiennent aux genres, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* et *Flavobacterium* (MIKOLAJCIK, 1979). Ces bactéries sont responsables de la production de protéases et de lipases entraînant la détérioration du lait (COUSIN, 1982). Les bactéries psychrotrophes à Gram positif sont également présentes dans le lait, mais en plus faible nombre. Ces bactéries s'elles appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Sarcina*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Les genres à GRAM positif dominants dans le lait sont : *Arthrobacter* et *Bacillus*. Certaines bactéries à GRAM positif tels que les genres *Bacillus* et *Clostridium*, peuvent produire des spores (GRIFFITHS ET PHILLIPS, 1990).

La contamination du lait par les bactéries psychrotrophes est essentiellement un problème d'hygiène. Ces germes sont largement disséminés dans la nature. Ce sont les hôtes habituels du sol, des plantes, des eaux et du fumier. Les eaux d'alimentation des fermes sont souvent très contaminées. Ils peuvent aussi être véhiculés par un air chargé de poussière de fourrage ou autres aliments. Leur présence dans le lait cru est due à des pollutions dont l'importance dépend des conditions de propreté de la traite et du matériel de collecte, de transfert et de conservation du lait, de la qualité des eaux de nettoyage et de rinçage, et du mode d'alimentation de bétail (VERON, 1987).

Les bactéries psychrotrophes possèdent une relative capacité de résistance au «stress froid», mettant en jeu des mécanismes dont les principaux sont la synthèse d'enzymes adaptées à fonctionner à basse température, l'adaptation par la composition des membranes riches en acides gras insaturés et la synthèse de protéines « de choc thermique» (DRUESNE, 1996 ; GOUNOT, 1991).

A l'exception de quelques espèces thermorésistantes, les psychrotrophes sont détruits par la pasteurisation à 74°C pendant 15 secondes, voire par une thermisation à 65°C pendant 20 secondes. Mais certaines produisent des enzymes qui résistent à des traitements thermiques élevés de l'ordre de 90 à 100°C pendant plusieurs minutes.

1.2.2.1. *Pseudomonas fluorescens*

Dans la filière laitière, les *Pseudomonas* producteurs de pigments vert fluorescent abusivement regroupées sous l'appellation « *Pseudomonas fluorescens* », sont considérés comme un problème majeur. Leur caractère psychrotrophe associé à la disparition de la flore compétitrice est très probablement responsable de leur émergence durant la conservation du lait à basse température (PITON et RECHARD, 1986).

Le genre *Pseudomonas* regroupe plus de 140 espèces qui présentent les caractères communes suivantes : ce sont des bacilles de taille de 0.5- 1.0 × 1.5-5.0 µm qui sont, la plupart du temps mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Ils réagissent négativement à la coloration de GRAM et peuvent accumuler des réserves de poly- hydroxybutyrate. Aérobie, elles possèdent un métabolisme oxydatif et utilisent alors l'oxygène comme accepteur final des électrons. Cependant, quelques espèces sont capables de se multiplier en anaérobiose en présence de nitrate (chimio-organotrophes). La plupart sont incapables de se multiplier en milieu acide (pH < 4.5). Enfin, ils peuvent être oxydase (+) ou moins, mais sont toujours catalase (+). La fluorescence de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine (pyoverdine) de couleur jaune à vert. Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30 °C. Sa croissance à 42 °C est négative : ce point est important pour la différencier de *Pseudomonas aeruginosa* (LERICHE et al, 1999).

Les principaux caractères physiologiques et biochimiques de l'identification des *Pseudomonas* sont indiqués sur le tableau III (GUIRAUD, 2003).

1.2.2 .2. Impact des bactéries psychrotrophes dans le lait

La plupart des bactéries psychrotrophes ne causent pas de problèmes dans le lait car elles sont éliminées par la pasteurisation. Cependant, les enzymes des psychrotrophes (protéases et lipases) sont thermorésistantes et ne sont pas dénaturées par la pasteurisation. Plusieurs auteurs ont rapporté les impacts des enzymes des psychrotrophes dans le lait et les produits laitiers (FAIRBAIM et LAW, 1986 ; DEETH et al, 2002 ; NIELSEN, 2002). Les Protéases des bactéries psychrotrophes sont des enzymes exocellulaires et thermorésistantes, capables de

dégrader les constituants du lait et d'occasionner des défauts en cours de stockage (**MIRANDA et GRIPON, 1986**). La synthèse de protéases exocellulaires par les bactéries psychrotrophes s'effectue pendant la phase exponentielle de la courbe de croissance (**ADAMS *et al*, 1975**) et le maximum de production a lieu en fin de phase exponentielle et au début de la phase stationnaire (**ROWE et GILMOUR, 1982**). La plupart des protéases de bactéries psychrotrophes résistent aux températures élevées et ne sont que partiellement détruites par différents traitements de stérilisation UHT (120 à 150° C, 5 à 20 secondes) (**ADAMS *et al*, 1975 ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977 ; TE WHAITI et FRYER, 1978 ; DRIESSEN, 1983**). De nombreux travaux ont établi une relation entre la présence de protéases thermostables de bactéries psychrotrophes et l'altération de la durée de vie du lait UHT. Celle-ci se manifeste par l'apparition de goûts amers (**BENGTSOON *et al*, 1973 ; RICHARDSON et NEWSTEAD, 1979 ; Mc KELLAR *et al*, 1984**) et de phénomènes de gélification (**ADAMS *et al*, 1976 ; BENGTSOON *et al*, 1973 ; LAW *et al*, 1977 ; SNOEREN *et al*, 1979**). Les protéases des bactéries psychrotrophes interviennent également en fromagerie où elles sont à l'origine de pertes d'azote dans le lactosérum et de diminution du rendement fromager. Il a été montré que les protéases des bactéries psychrotrophes peuvent provoquer une protéolyse incontrôlée des constituants du lait. Au cours de leur activité, elles dégradent les protéines du lait à pH optimum situé entre 6,5 et 8,0 (**MAYERHOFER *et al*, 1973 ; ADAMS *et al*, 1975 ; ALICHANIDIS et ANDREWS, 1977**), ce phénomène produit la libération de sous produits très variés, dont les peptides à longues chaînes ou à courtes chaînes et des acides aminés libres. Elles ont une action comparable à celle de la présure. Elles attaquent préférentiellement la kappa- caséine, puis la β caséine et enfin la α_{s1} caséine. Les protéines non dénaturées du lactosérum sont insensibles à l'action de ces enzymes (**DE BEUCLAR *et al*, 1977**). Les principaux microorganismes psychrotrophes protéolytiques associés aux produits laitiers (**VIGNOLA, 2002**) sont les suivants:

-*Pseudomonas sp.*

-*Bacillus sp.*

-*Clostridium sp.*

-*Flavobacterium sp.*

Tableau III : Caractéristiques de principales espèces de *Pseudomonas* selon GUIRAUD (2003)

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.cepacia</i>	<i>P.chlororaphis</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.mallei</i>	<i>P.pseudomallei</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.solanacearum</i>	<i>P.syringae</i>
Groupe Génomique	I	II	I	I	II	II	I	II	I
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Nitrate Réductase	+	+	+	V	+	+	-	+	-
Gélatinase	+	V	+	+	+	+	-	-	-
Lécithinase	-	V	V	+	.	.	-	-	V
Mannitol	-	-	V	-	V	+	-	V	V
Pigments Fluorescents	+	-	+	+	-	-	+	-	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PHB (Accumulation)	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Culture à 4°C	-	-	+	+	-	-	-	-	V
Culture à 41°C	+	V	-	-	+	+	-	-	-

V : variable

-*Alcaligenes sp.*

-Levures et moisissures.

Certains microorganismes, grâce à leurs lipases peuvent décomposer la matière grasse et les acides gras libres du lait, entraînant l'apparition des odeurs rances dans les produits laitiers. Les principaux microorganismes psychrotrophes lipolytiques (**VIGNOLA, 2002**) sont les suivants:

-*Pseudomonas sp.*

-*Bacillus sp.*

- *Clostridium sp.*

-Levures et Moisissures.

Le tableau IV récapitule les activités métaboliques et les dégradations d'origine microbienne dans les produits laitiers.

1.2.3. Aptitude du lait de chamelle à la transformation en fromage

Le fromage, selon la norme Codex, est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi dure, dure ou extra dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/ caséines ne dépasse pas celui du lait (**VIGNOLA et al, 2002**). Le fromage est un mode de conservation des deux principaux constituants insolubles du lait, la caséines et la matière grasse, et d'une partie plus ou moins importante de sels minéraux et des éléments solubles (**DE ROISSART, 1986**).

Pour la fabrication du fromage trois étapes essentielles sont nécessaires : la coagulation de la caséine qui conduit, à partir du lait, à la formation d'un caillé (sous l'effet d'une acidification par la fermentation lactique et /ou par l'addition d'un agent coagulant enzymatique qui est la présure) ; l'égouttage , qui sert à séparer une partie plus ou moins importante de sérum pour obtenir une caillebotte ; l'affinage de cette caillebotte, qui développe des saveurs et des textures originales, sous l'influence des systèmes enzymatiques présents à l'origine dans le lait (enzymes endogènes) ou des agents coagulants et des flores microbiennes d'intérêt . Ce sont les différentes techniques associées à chacune de ces trois étapes qui déterminent les différences entre les fromages (**VIGNOLA et al, 2002**). Dans les traditions pastorales, le lait camelin est principalement réservé à l'alimentation du jeune dromadaire et à celle de l'homme. Ce lait, est le plus souvent bu

immédiatement après la traite. Il peut être également consommé sous forme de laits fermentés obtenus par acidification lactique naturelle pendant quelques heures dans des récipients en peau ou en terre cuite (RAMET, 1987; RAMET, 1989 ; YAGIL, 1982).

Tableau IV : Activités métaboliques et dégradations d'origine microbienne dans les produits laitiers (VIGNOLA, 2002)

Action microbienne	Composantes	Réaction	Produits de répercussion	Microorganisme responsables
Protéolyse (protéases)	protéines	Protéines ↓ peptides longs (amertume) ↓ peptides courts ↓ Acides aminés	- acides aminés ou dérivés, composés soufrés, composés ammoniacaux, polypeptides. -amertume, goût de fruits, de vanille ou de malt dans le lait. -amertume, saveurs inhabituelles et perte de rendement dans les fromages	-bactéries sporulées (thermophiles ou mésophiles) <i>-Bacillus</i> <i>-Clostridium</i> <i>-Pseudomonas</i> <i>-Flavobacterium</i> <i>-Alcaligenes</i> -Levures et moisissures
Lipolyse (lipase)	Lipides	Lipides ↓ Glycérol +acides gras libres	-Rancidité des produits laitiers. -odeurs butyriques	-bactéries sporulées (thermophiles ou mésophiles) <i>-Bacillus</i> <i>-Clostridium</i> <i>-Pseudomonas</i> -Levures et moisissures

Le lait camelin a constitué depuis des temps très lointains un produit nourricier de la population nomade qui le consomme à l'état frais ou fermenté (**RAMET, 1994 ; KIHAL, 1999**).

La transformation du lait de dromadaire en produits dérivés de type fromage est réputée très difficile, voire impossible. Il n'existe pas de tradition fromagère exploitant le lait de dromadaire, situation tout à fait surprenante et exceptionnelle au regard de la plupart des systèmes pastoraux qui ont très souvent développé un ou plusieurs types de fromages originaux. Ce constat peut être expliqué par certains interdits culturels et locaux qui limitent la consommation du lait camelin à la forme boisson et en excluent toute possibilité de négoce. Il est probable également que le caractère très altérable de la plupart des fromages en climat chaud, n'a pas favorisé la création de courants d'échanges entre des populations par ailleurs isolées et souvent enclavées, comme cela existe pour d'autres produits moins périssables (**DICKSON, 1951; GAST et al, 1969; YAGIL, 1982; WILSON, 1984**).

Outre les causes culturelles précitées, il apparaît également que, du point de vue technologique, le lait de dromadaire est plus difficile à transformer que le lait des autres espèces animales domestiques. L'étude bibliographique indique que seuls quelques rares fromages sont fabriqués en Ahaggar et dans la péninsule du Sinaï, par séparation des protéines de lait préalablement insolubilisées par acidification (**GAST et al, 1969 ; YAGIL, 1982**). Le fromage ainsi obtenu se présente sous forme d'une pâte humide présentant les caractéristiques des fromages frais. Il s'agit d'un produit altérable en raison d'une forte teneur en eau. Il doit être consommé rapidement. Toutefois, par salage et séchage naturel au vent et au soleil, il est possible de prolonger considérablement la conservation du produit et de le porter à plusieurs mois. La transformation de lait de chamelle en fromage présente des difficultés ayant pour origine une teneur réduite en caséine Kappa et une aptitude très limitée à l'acidification et à la coagulation enzymatique (**RAMET, 2003**).

Ces fromages frais, éventuellement séchés, ne correspondent pas à la définition vraie du fromage qui fait intervenir, dès le début de la fabrication lors de la coagulation, une action plus ou moins importante d'une enzyme coagulante conjointement à l'acidification par voie fermentaire (**RAMET, 1985**). De plus, une caractéristique originale des caséines camelines est qu'elles se trouvent sous forme de micelles de grande taille dont le diamètre moyen est environ le double (300 µm) de celui du lait de vache (160 µm) (**FARAH et BACHMAN, 1987; JARDALI, 1988; FARAH ET RUEGG, 1989; JARDALI et RAMET, 1991**).

Parmi les différentes méthodes de corrections proposées, le mélange de lait caséineux provenant d'autres espèces (ovins, bovins) permet de renforcer l'aptitude fromagère. L'expérimentation confirme, en particulier, l'intérêt d'utiliser le lait de brebis en quantités limitées (10 à 30 pour cent du mélange) pour améliorer considérablement les modalités de la coagulation et de l'égouttage, ainsi que les rendements fromagers (**RAMET, 2003**). D'autres travaux réalisés en Egypte (**EL-ABASSY, 1987; EL-BATAWY et al, 1987**) ont montré que la pepsine provenant de l'estomac de dromadaire adulte pouvait être utilisée pour produire une préparation coagulante dans des conditions acceptables d'activité et de stabilité.

Plus récemment, des études ont été réalisées au niveau des laboratoires de l'université KASDI MERBAH à Ouargla dans le but d'améliorer la coagulabilité du lait camelin (**SIBOUKEUR et al., 2005 ; MAHBOUB et al., 2010**). Les résultats obtenus ont été très satisfaisants. Le fromage fabriqué a présenté une bonne consistance et une qualité organoleptique satisfaisante (**BOUDJENAH-HAROUN et al., accepté sous presse**).

1.2.4. Bactéries lactiques et fabrication du fromage

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes qui partagent les caractéristiques communes suivantes (**DELLAGLIO et al, 1994**). Elles sont GRAM +, généralement immobiles et asporulées, micro-aérophiles. Du point de vue enzymatique, elles ne possèdent ni catalase (certaines souches ont une pseudo-catalase), ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. Elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux. Quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. En outre, elles ont des exigences nutritionnelles complexes envers les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. Il est possible de les classer suivant la nature des produits obtenus à partir des glucides : en bactéries homolactiques strictes produisant uniquement de l'acide lactique et en bactéries hétérolactiques facultatives produisant un mélange d'acides, lactique et acétique. Les bactéries hétérolactiques strictes produisent de l'éthanol ou du CO₂, en plus des acides lactique et acétique. Certaines souches ou certaines espèces peuvent également produire des acides, formique et succinique. Les bactéries lactiques appartiennent aux douze genres suivants : ***Streptococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenoccus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Atopobium*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium*.**

1.2.4.1. *Lactococcus lactis*

Les bactéries appartenant au genre *Lactococcus* se présentent sous forme de coques rassemblées en chaînes de longueur variable. Elles appartiennent au groupe N de la classification de Lancefield. Elles sont faiblement α -hémolytiques et non β -hémolytiques (DELLAGLIO *et al*, 1994).

Les lactocoques ont une température de croissance minimale inférieure à **10°C**, et une température de croissance optimale de **30°C**. Ces bactéries sont thermosensibles, et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de Na Cl, ou lorsque le pH est supérieur à **9,6**. Elles ont un métabolisme homofermentaire et produisent exclusivement de l'acide lactique L (+) (TEUBER *et al*, 1992 ; DELLAGLIO *et al*, 1994).

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces. Pour la fabrication fromagère (cheddar, fromage frais ...) ou la fermentation de la crème, les trois espèces suivantes sont utilisées : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (TEUBER *et al*, 1992). Ces sous-espèces et biovariants 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. Le tableau VI indique les principaux caractères d'identification des lactocoques (GUIRAUD, 2003).

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* var *diacetylactis*, utilise le citrate, produit du diacétyle, de l'acétoïne et du CO₂ (CHAMBA ,2000).

- **Habitat**

Les bactéries du genre *Lactococcus* sont les bactéries lactiques les plus importantes d'un point de vue commercial. Les habitats les plus importants des lactocoques demeurent le lait, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, on peut également les isoler des plantes (SANDINE *et al* ,1972) ainsi que de la peau de certains animaux, et il semble que la contamination qui a lieu au cours de la traite ait pour origine principale le fourrage (RAUNAUD ,2006).

1.2.4.2. Rôle de *Lactococcus lactis* dans la fabrication du fromage

Lactococcus lactis est la seule espèce de lactocoques utilisée industriellement en fromagerie (HOLLER et STEELE, 1995). 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).

1.3. Bactériocines

Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries, de nature protéique ou peptidiques et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis des souches phylogénétiquement proches des souches productrices. Leur synthèse par voie ribosomique, les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (CENATIEMPO *et al*, 1996). Deux grands groupes de bactériocines peuvent être distingués avec, d'une part, les bactériocines produites par des bactéries à GRAM négatif, principalement représentées par les colicines et les microcines, et d'autre part, celles produites par les bactéries à GRAM positif, et notamment les bactériocines de bactéries lactiques (MORISSET ,2003). La découverte des bactériocines remonte à 1925 quand GRATIA appela "colicines" des substances antibactériennes sécrétées par *E. coli* ϕ active contre *E. coli* V. Des substances semblables sécrétées par des bactéries à GRAM positif ont été découvertes. Elles ont été appelées « bactériocines ». Il a été rapporté pour la première fois par ROGERS en 1928, qu'une substance antimicrobienne produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* avait une activité inhibitrice sur *Lactobacillus delbruckii* ssp. *bulgaricus*.

La nature protéique de cette substance a été identifiée par **HIRCH** en 1951 qui l'appela nisine. "n" désigne les streptocoques de groupe N selon la classification de Lancefield (1993). "is" est l'abréviation de « Inhibitory Substances » et "ine" désigne une bactériocine (**DE VUYST** et **VANDAMME**, 1994) cité par (**DAOUDI**, 2000). La production d'une bactériocine peut être considérée comme une façon d'éliminer des bactéries envahissantes qui font compétition à la bactérie productrice pour les nutriments. Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice. Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique (**LACHANCE**, 2000). Des critères ont été établis pour définir les bactériocines :

- Ce sont des protéines Elles ont une activité bactéricide et pas seulement bactériostatique ;
- Elles ont des sites de liaisons spécifiques dans la membrane des bactéries cibles ;
- leur synthèse est associée à la synthèse d'une protéine d'immunité qui évite de provoquer la mort de la cellule excrétrice ;
- elles ont un spectre d'activité étroit (**TROUPEL**, 2007).

1.3.1. Bactériocines des bactéries lactiques

Depuis des temps immémoriaux les bactéries lactiques (BL) ont été utilisés comme ferments dans les aliments en vue de leur conservation. Vu les réglementations imposées aujourd'hui concernant l'utilisation de certaines substances chimiques non désirables dans les aliments, il y a eu un intérêt de plus en plus élevé vers l'utilisation des produits naturels comme industriels. Il a été montré que les BL ont la capacité de produire des acides organiques, tel l'acide lactique, de tolérer les milieux à faibles pH (**TRAMER**, 1961), de produire du peroxyde d'hydrogène (**WHEARER** et al, 1952) ainsi que des substances antibactériennes appelées bactériocines (**KLAENHAMMER**, 1988). La production de bactériocines a été mise en évidence chez tous les genres de bactéries lactiques. Cependant les caractéristiques chimiques, biochimiques et génétiques de la plupart de ces substances ne sont pas encore bien élucidée (**DE VUYST** et **VANDAMME**, 1991).

1.3.1.1. Classification des bactériocines des bactéries lactiques

La première classification fut élaborée par **KLAENHAMMER** en 1988. Elle séparait les bactériocines des bactéries lactiques en deux groupes, selon l'étendue de leur spectre d'inhibition. Cette classification fut réactualisée en 1993, suite au développement des méthodes biochimiques

Tableau V : Caractéristiques des genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (GUIRAUD, 2003)

	<i>Enterococcus</i>			<i>Lactococcus</i>			<i>Streptococcus</i>					
	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>L. diacetylactis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. boris</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>
Groupe génomique	D	D	D	N	N	N	B	D	C	-	A	-
Hémolyse	αβ	β	α	γ	γ	γ	β	α	α	α	B	α
Croissance à 10°C	V	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	-
Croissance à 45°C	+	+	+	-	-	-	-	V	-	V	-	+
Croissance à pH 9,6	+	+	+	+	-	+	-	V	-	V	-	-
Croissance à 6,5 % Na Cl	+	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Croissance sur milieu bilié	+	+	+	-	-	-	V	+	-	V	-	-
Résistance 30 min à 63°C	V	+	+	V	V	V	-	+	-	-	-	+
Résistance à l'optochine	.	.	.	.	.	.	+	+	+	V	+	V
Croissance sur lait au bleu de Sherham	V	+	+	+	V	+	-	-	-	.	.	-
Hydrolyse de l'Arginine	+	+	+	+	-	+	+	-	+	V	+	V
Résistance au tellurite	-	+	-	.	.	.	.	.	.	.	.	-
Hydrolyse de l'hippurate	V	+	+	-	V	V	+	-	-	-	-	-
Réduction du TTC	-	+	-	.	.	.	.	V	.	.	.	.
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	.	AC	.	.	A	AC
Lactose	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	-	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Melibiose	-	-	V	-	-	-	.	.	.	.	.	.
Acétoine (VP)	V	V	V	+	-	-	V	V	-	-	-	V
Citrate	V	+	-	+	-	+	.	.	.	.	.	V
CO ₂ sur citrate	-	-	.	+	-	-	.	.	.	.	.	-
β-glucoronidase	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	.
Gélatinase	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-	-	+	.	-	-	+
Esculine	+	+	+	V	V	V	-	+	-	V	V	-

V : variable, (.) : non déterminé, ARC : Acidification Réduction Coagulation

et génétiques, se basant alors sur la structure et le mode d'action des bactériocines (**HENG et TAGG**, 2006) (Tableau VI). Les bactériocines des BL peuvent être subdivisées en trois classes selon leur structure primaire, leur poids moléculaire et leur stabilité à la chaleur (**DE VUYST et VANDAMME**, 1994) cité par **DAOUDI** (2000) :

Les Lantibiotiques : ce sont de petites molécules (entre 19 et 37 acides aminées) stables à la chaleur. Dans cette classe on retrouve la nisine, la lacticine 481, la lactocine S et la carnocine U 149 (fig.1).

Les non-lantibiotiques de faible poids moléculaire : ce sont des bactériocines de poids moléculaire inférieur à 15000 et stables à la chaleur (entre 30 min. à 100°C et 15 min. à 121°C), Cette classe regroupe la diplococcine, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F, la sakacine A, la pédiocine PA -1, la leucocine A-UAL 187 et enfin les carnobactériocines.

Les non-lantibiotiques de haut poids moléculaire : ce sont des bactériocines de poids moléculaire supérieur à 15 000 et sensibles à la chaleur (inactivées entre 10 à 15 min. à 60-100°C). On y retrouve l'helvéticine J, l'acidophilucine A, la lacticine A et B et la caséicine 80.

Tableau VI : Classification des bactériocines des bactéries lactiques (HENG et TAGG, 2006)

Classes	Sous-classes
Classe I- Lantibiotiques	Contiennent des lanthionines et des β -méthyl- lanthionines Ia : molécules linéaires Ib : bactériocines globulaires Ic : bactériocines composées de plusieurs peptides
Classe II- Peptides non modifiés	IIa : bactériocines apparentées à la pédiocine IIb : peptides de type divers IIc : bactériocines composées de plusieurs peptides
Classe III- Protéines de poids moléculaire élevé	IIIa : bactériocines bactériolytiques IIIb : peptides non lytiques

1.3.1.2. Intérêts des bactériocines

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes), stables dans des zones de pH de 3 à 8 et sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal). De plus, contrairement à certains autres peptides antimicrobiens d'invertébrés et vertébrés, elles ne montrent pas d'activité hémolytique vis à vis des cellules eucaryotes (**NES et HOLO, 2000**).

Parmi les applications réelles ou envisagées pour les bactériocines de bactéries lactiques, on peut citer l'utilisation de ferments producteurs de bactériocines dans l'industrie laitière (cependant peu de ferments de ce type sont utilisés) (**CLEVELAND et al, 2001**). La fixation des bactériocines sur des polymères pour l'emballage d'aliments pourrait aussi être un mode de conservation des aliments (**SEBTI et al, 2002**).

Différentes bactériocines trouvent des applications dans les domaines, médicaux et vétérinaires. Par exemple, la nisine a fait l'objet d'un brevet (**BLACKBURN et PROJAN, 1994**) quant à son utilisation dans la prévention et le traitement d'ulcère causé par *Helicobacter pylori*. Elle est, de plus, connue pour être un agent thérapeutique potentiel des mastites bovines, et est déjà utilisée comme agent prophylactique. Différentes études ont été réalisées sur l'utilisation de la nisine en solution buccale. Elle a démontré une action préventive contre la plaque dentaire et les inflammations gingivales chez le chien (**HOWELL et al, 1993**).

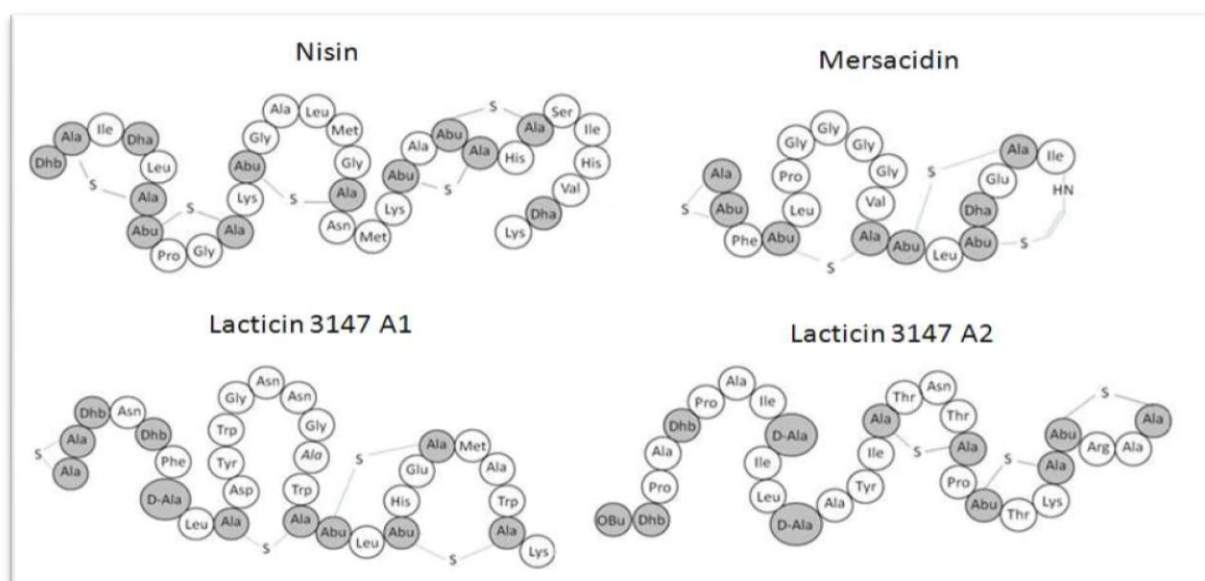


Figure 2 : Structure de quelques bactériocines des bactéries lactiques (les lantibiotiques).

1.3.2. Production et conditionnement des bactériocines

1.3.2.1. Production des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**SAVIJOKI et al**, 2006) ou être adsorbées à sa surface ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (**DORTU et THONART**, 2008).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches, contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines, sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (**AASEN et al**, 2000 ; **NEL et al**, 2001 ; **MATARAGAS et al**, 2004 ; **TODOROV et al**, 2004 ; **VERLUYTEN et al**, 2004).

D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (**LEAL-SANCHEZ et al**, 2002 ; **LEROY et al**, 2006 ; **CHEN et al**, 2007 ; **ANASTASIADOU et al**, 2008). L'ajout de ces nutriments lors d'une culture Fed-batch permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en batch (**CALLEWAERT et al**, 2000 ; **GUERRA et al**, 2005 ; **Lv. et al**, 2005).

L'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (**SCANNELL et al**, 2000 ; **PONGTHARANGKUL et al**, 2006).

1.3.2.2. Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. Leur purification est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et

une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors de l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice, en une centrifugation ou une ultrafiltration de la culture et une désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple (**PARENTE et al**, 1999). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée (**DORTU**, 2008).

1.3.3. Mode d'utilisation des bactériocines

Les bactériocines peuvent être utilisées dans les aliments selon trois procédés :

- **inoculation de la souche productrice de bactériocine dans le produit** : si la bactérie lactique est naturellement présente dans le produit alors dans ce cas elle se développe normalement et produit la substance inhibitrice au cours de sa phase exponentielle de croissance. Si au contraire, il faut implanter la souche productrice, le succès de l'opération dépend de la capacité de la souche à se développer et à produire la bactériocine dans un environnement nouveau. Les conditions de culture (température, pH, aw, exigences nutritionnelles dans l'aliment) peuvent ne pas convenir au développement du microorganisme souhaité ;
- **utilisation d'une préparation semi-purifiée de bactériocine** : le plus souvent, il s'agit du milieu de culture fermenté débarrassé des cellules bactériennes ;
- **utilisation de la bactériocine pure** : dans ce cas, la bactériocine n'est pas accompagnée de substances nuisibles au procédé de fabrication ou à l'obtention du produit souhaité (**METIVIER**, 1997)

1.3.4 .La nisine

La nisine est un agent antimicrobien produit par quelques souches de *Lc. lactis* sp. Elle appartient au groupe des bactériocines définies par **TAGG et al**, (1976) comme des composés protéiques ayant une activité inhibitrice contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. De nombreuses bactériocines répondent à cette définition mais certaines d'entre elles présentent un spectre d'activité plus large, s'étendant à des souches plus éloignées (**KLAENHAMMER**, 1993). La nisine fut découverte en 1928 par **ROGERS** lorsqu'il s'aperçut qu'un métabolite produit par *Streptococcus lactis* (*Lc. lactis* dans la nouvelle nomenclature) possédait une activité inhibitrice contre d'autres bactéries lactiques.

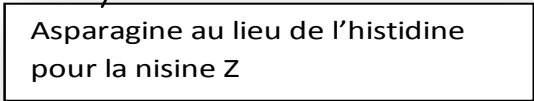
La nisine appartient à la classe I des bactériocines (**KLAENHAMMER**, 1993). Cette classe regroupe les composés protéiques d'une taille inférieure à 5 k Da et contenant les acides aminés modifiés thioéther lanthionine et méthyl-lanthionine et des acides aminés déshydratés tels que le didéshydrobutyrine (Dhb) et didéshydroalanine (Dha). Le terme lantibiotique (par contraction des mots lanthionine et antibiotique) leur est généralement réservé (**SAHL et al**, 1998).

1.3.4.1. Structure et propriétés physico-chimiques

La nisine est un peptide de 3488 Da constitué de 34 acides aminés dont la structure est représentée dans la figure 3. Les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou en oligomères de 7000 à 14000 Da (**KLAENHAMMER**, 1993) via des réactions intermoléculaires entre les résidus Dha et Dhb. La conformation en anneaux des lanthionines assurerait la rigidité du peptide, diminuerait sa sensibilité à la protéolyse et augmenterait sa résistance à la chaleur (**Mc AULIFFE et al**, 2001). **MULDERS et al**, (1991) ont isolé un variant naturel de la nisine A, la nisine Z, qui diffère par un acide aminé en position 27. La spécificité de l'activité antimicrobienne des deux variants est identique. Cependant, des tests d'activité menés par la technique de diffusion en gélose et des concentrations en bactériocines supérieures à 0.1 µg/ml ont montré que la nisine A donnait des zones d'inhibition d'un diamètre inférieur à celles de la nisine Z à concentrations identiques (**DE VOS et al**, 1993). Cette différence s'explique par une meilleure diffusion de la nisine Z dans l'agar (**DE VOS et al**, 1993). La solubilité de la nisine est fonction du pH et de la force ionique de la solution (**ROLLEMA et al**, 1995). Au dessous de pH 5, la nisine A présente une solubilité supérieure à celle de la nisine Z. Dans des conditions de pH neutre ou basique, la solubilité des deux variants est comparable (**ROLLEMA et al**, 1995). Le pH influence de façon importante la stabilité de la nisine à la température (**HURST**, 1981 ; **ROLLEMA et al**, 1995). La nisine dans une solution à pH 5.0 et 6.8 perd respectivement 40 et plus de 90 % de son activité après un autoclavage à 115.6°C, alors qu'à pH 2 aucune diminution de l'activité n'est observée (**HURST**, 1998).

1.3.4.2. Biosynthèse de la nisine

Les bactériocines sont directement produites par la voie ribosomique, sous la forme de polypeptide ou de prépeptide, contrairement aux antibiotiques ou aux toxines qui sont plutôt synthétisés par des cascades enzymatiques (**JACK et al**, 1995). Trois classes de transposons d'une



0

1.3.4.3. Spectre d'activité

La nisine possède une action inhibitrice sur les bactéries à GRAM positif. Parmi toutes les bactériocines, la nisine possède un spectre d'activité très large incluant des souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* et *Staphylococcus* ainsi que des cellules végétatives et des spores de *Clostridium* et *Bacillus* (MEGHROUS *et al*, 1999).

Dans des conditions normales, les bactériocines produites par des bactéries à GRAM positif n'ont pas d'effet bactéricide sur des espèces à GRAM négatif. Cependant, la nisine présente une activité inhibitrice contre des souches d' *Helicobacter pylori* et de *Neisseria* (MOTA-MEIRA *et al*, 2000) et de *Salmonella* en présence d'EDTA (STEVENS *et al*, 1991). Il est connu depuis longtemps que les bactéries à GRAM négatif ne sont pas affectées par la nisine. STEVENS *et al*. (1991) ont confirmé les résultats obtenus par BLACKBURN *et al*. (1989) sur l'inhibition des espèces de *Salmonella* et d'autres bactéries à GRAM négatif. L'effet bactéricide d'une combinaison de nisine (0.1 à 300 UI/ m) avec un agent chélateur comme l'EDTA (0.1 à 20 mM) sur les bactéries à GRAM négatif incluant les espèces de *Salmonella*, *E. coli* et *Pseudomonas*, a été démontré. Cette combinaison fragilise et désorganise la membrane externe de ces bactéries et permet à la nisine d'être en contact avec leur membrane cytoplasmique pour la déstabiliser (STEVENS *et al*, 1992).

1.3.4.4. Mode d'action

La première cible de la nisine se situe au niveau de la membrane cytoplasmique des souches sensibles (SAHL *et al*, 1998). Des deux modèles proposés dans la littérature pour expliquer la formation des pores transmembranaires par la nisine, celui de DRIESSEN *et al*. (1995) et VAN DEN HOOVEN *et al*. (1996) est généralement retenu (SAHL *et al*, 1998). Le modèle est représenté par la figure 4. Les forces d'attraction électrostatiques entre les charges négatives des têtes phospholipidiques de la membrane et les charges positives des résidus de lysine de l'extrémité C-terminale de la nisine seraient à l'origine des interactions entre les molécules de nisine et la membrane (BREUKINK *et al*, 1998). Le caractère amphiphile de la nisine lui permettrait ensuite de s'insérer dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (VAN DEN HOOVEN *et al*, 1996). L'accumulation de plusieurs molécules de nisine au même point conduirait à la formation d'un pore. Tout en restant attachées à la surface, les molécules de nisine se déplaceraient à travers la membrane, en réponse au potentiel électrique, entraînant avec elles les lipides de la couche

externe du côté cytoplasmique (**MOLL et al**, 1996). La formation transitoire de ces pores s'accompagne d'une rupture de la force proton- motrice par dissipation du potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$ et du gradient de pH conduisant à l'arrêt de toutes biosynthèses (**MONTVILLE et al**, 1994). Les pores entraînent également le passage dans le milieu extracellulaire d'ATP, d'acides aminés, de potassium et de phosphate inorganique (**RUHR et al**, 1985 ; **ABEE et al**, 1994).

Le deuxième mode d'action de la nisine est l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (**REISINGER et al**, 1980). Cette inhibition résulterait de la formation d'un complexe entre le précurseur lipidique membranaire du peptidoglycane, le lipide II, et les molécules de nisine. Le lipide II est également la seule cible spécifique de la nisine pour la formation de pores (**Mc AULIFFE et al**, 2001). Cette association engendre des pores stables et uniformes composés de 8 molécules de nisine et 4 de lipides II selon un nouveau modèle proposé par **HASPER et al**. (2004).

1.3.4.5. Toxicité de la nisine

Les bactériocines sont dégradées par certains enzymes protéolytiques. La non-toxicité de la nisine, la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire, a été démontrée (**TURTELL et DELVES-BROUGHTON**, 1998). De plus, un facteur important à considérer est que la nisine présente dans les aliments, est facilement dégradée par les enzymes digestifs sans toutefois générer des produits toxiques (**HURST**, 1981). Ainsi, l'organisation de l'agriculture et de l'alimentation (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont recommandé une prise moyenne journalière (Average Daily Intake: ADI) de 0 à 33 mg de nisine par kg de poids corporel. La nisine a été approuvée pour des utilisations spécifiques dans différents produits alimentaires dans 50 pays dont les Etats-Unis (**TURTELL et DELVES-BROUGHTON**, 1998 ; **DELVES-BROUGHTON**, 1997). Toutefois son usage alimentaire reste restreint à certains aliments (**BOUKSAIM**, 1999).

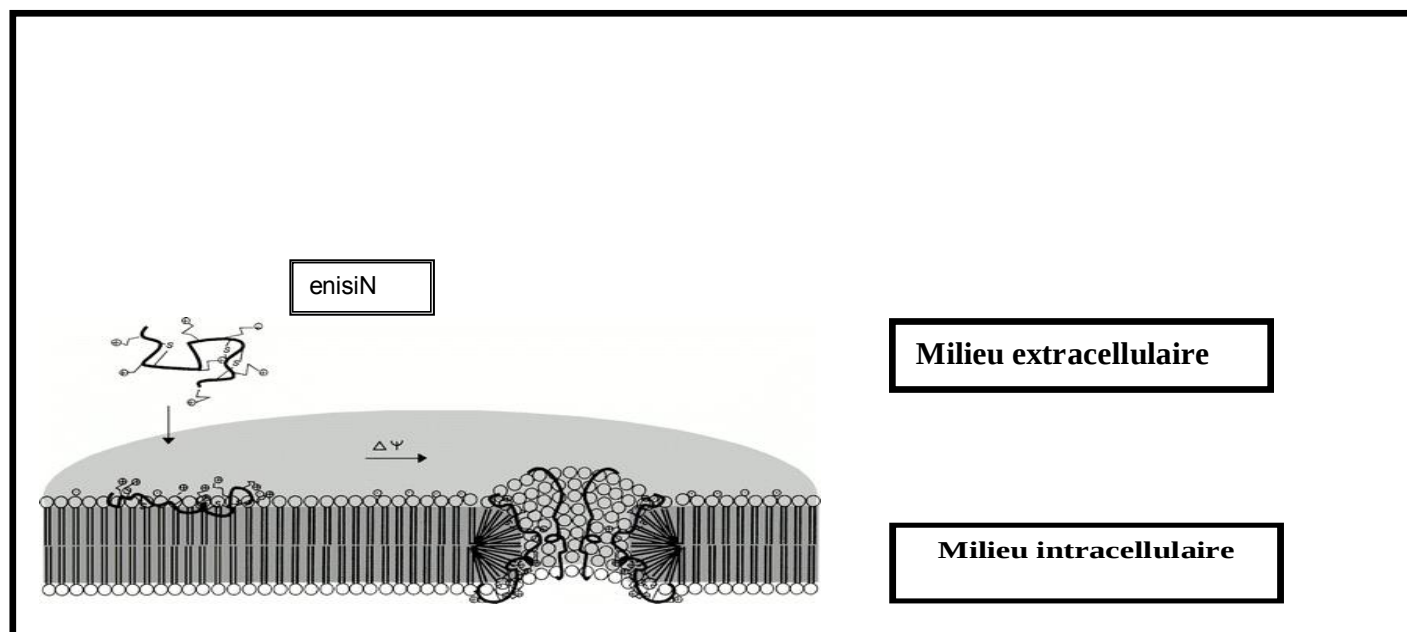


Figure 4 : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine (SAHL et al, 1998).

1.3.4.6. Rôle de la nisine dans la conservation des aliments

Les spectres d'action antimicrobienne de la nisine et de la pédiocine sont larges. Elles agissent à de très faibles concentrations sur des bactéries pathogènes ou d'altération alimentaire (De VUYST et VANDAMME, 1994). Cependant, la nisine est la plus connue et la seule bactériocine des BL acceptée comme bio-ingrédient dans les aliments par FDA (1988). La nisine est surtout réputée pour son efficacité contre les spores de *Clostridium* et de *Bacillus*, fréquemment responsables de la détérioration des conserves alimentaires (DELVES-BROUGHTON, 1990). L'efficacité de la nisine est dépendante de la qualité des aliments et est meilleure dans le cas où la charge des contaminants n'est pas élevée (DAOUDI, 2000). La conservation du lait par la nisine a été rapportée par WAJID et KALN (1976) qui ont montré que des échantillons du lait stérilisés et traités avec la nisine ont pu être conservés six mois à 37°C et trois semaines à 55°C. La nisine a été efficace contre les cellules végétatives ou les spores des bactéries contaminants sans qu'un traitement de réfrigération ne soit appliqué. La nisine a été utilisée pour la première fois dans un fromage de type Emmental pour empêcher le gonflement par *Clostridium butyricum* (HIRSCH et al, 1951) et contre la contamination par *C. botulinum* des fromages pasteurisés à pâte fondue (DELVES-BROUGHTON, 1990).

La nisine connaît une large application comme additif alimentaire dans les conserves de végétaux, soupes ou poudings à base de céréales (**ECKNER, 1992**). Il ressort que la nisine peut remplacer partiellement les nitrites reconnus pour être cancérigènes dans la conservation des aliments (**RAYMAN et al, 1981**). L'ajout de bactériocines dans les aliments permettrait non seulement de commercialiser des produits plus sains et plus sécuritaires mais aussi de diminuer l'emploi de conservateurs chimiques (**HARLANDER, 1993**).

Dans la viande l'utilisation de la nisine est limitée en raison de la quantité importante de nisine requise pour avoir un effet notable sur la durée de vie du produit (**TAYLOR et SOMERS 1985**). La faible solubilité, la distribution non homogène et le manque de stabilité des bactériocines à la surface des viandes ainsi que l'action des protéases des ferments utilisés ou de la viande peuvent affecter l'efficacité des bactériocines.

La Nisaplin, une préparation contenant 2.5% de nisine A pure, est utilisée à 10^6 UI/g dans les industries alimentaires pour la conservation (**DELVES-BROUGHTON, 1990**).

Les inconvénients liés à l'emploi des bactériocines tiennent à leur spectre d'action réduit aux bactéries à GRAM positif et à leur dépendance du pH, de la température, de la composition et la structure de l'aliment. De plus, vu la nature protéique de la nisine, son activité peut être réduite aussi par des enzymes protéolytiques, par oxydation, lors d'interaction avec des métaux lourds, lors d'agitation excessive ou après décongélation (**DAESCHEL et al, 1991**). Une perspective efficace contre la contamination des aliments serait l'utilisation combinée de la nisine et les traitements de conservation conventionnels (Pasteurisation, atmosphère modifiée ...) en vue d'aboutir à des produits stables et sécuritaires pour le consommateur. **TAYLOR et al.** (1990) ont rapporté qu'un emballage sous atmosphère modifiée (CO₂) ou sous vide combiné à l'utilisation de la nisine pourrait allonger significativement la durée de vie de certains poissons.

1.3.4.7. Méthodes de détection et de quantification de la nisine

Depuis les 50 dernières années, le dosage de la nisine a été effectué par les méthodes microbiologiques utilisant des techniques de dilution (**HIRSCH, 1950**), de turbidimétrie (**BEMDGE et BARRETT, 1952**) et de diffusion sur gélose (**TRAMER et FOWLER, 1964 ; DABA et al, 1994 ; DAOUDI, 2000**). Il existe plusieurs variantes de la méthode de diffusion dans l'agar, mais pour la plupart d'entre elles, l'observation d'une zone de lyse claire autour d'un puits ou d'une goutte indique la présence possible de l'activité d'une bactériocine. Des témoins négatifs sont nécessaires pour éliminer toute possibilité d'inhibition due à des acides organiques, des

bactériophages, du peroxyde d'hydrogène ou tout autre composé inhibiteur. Selon quelques auteurs, les méthodes turbidimétriques semblent plus sensibles que les méthodes de diffusion dans l'agar pour détecter l'activité bactériocinogène d'une bactérie (**PAPAGIANNI et al**, 2006; **PARENTE et al**, 1995 ; **TURCOTTE et al**, 2004). Des approches immunologiques (**BOUKSAIM et al**, 1998; **BOUKSAIM et al**, 1999; **KEREN et al**, 2004), des essais fondés sur l'induction de gènes de bioluminescence (**HARKONOVIRTA et al**, 2006 ; **REUNANEN et SARIS**, 2003) et la quantification du potassium largué hors de la cellule cible lors de la formation des pores (**MUGOCHI et al**, 2001) sont aussi d'autres possibilités pour vérifier l'activité bactériocinogène d'une bactérie. Par ailleurs, la quantification du potassium largué permet d'obtenir quelques informations sur le mode d'action des bactériocines (**MANTOVANI et RUSSELL**, 2003) cités par **CHAMPAGNE** (2007).

II-Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Echantillons de lait de chamelle

Le lait de chamelle utilisé dans la présente étude est un lait de mélange. Il est collecté le 26 février 2011, à partir d'un élevage implanté dans la région de Ghardaïa et conduit en semi-extensif (Pâturage du Mzab). Il est transporté dans des flacons stériles, dans une glacière, au laboratoire de l'université pour y subir des analyses, physico-chimiques et microbiologiques.

L'échantillon de lait collecté est divisé en deux parties, après avoir subi quelques analyses préliminaires :

- la première partie est immédiatement utilisée pour la préparation d'un fromage frais en vue de l'isolement de la souche lactique productrice de nisine ;
- la deuxième partie subit une conservation à 7°C pendant 10 jours, en vue de l'isolement de la souche psychrotrophe.

2.1.2. Appareillage

2.1.2.1. Appareils utilisés pour les analyses physico-chimiques

- pH-Mètre (METROHOM 620) ;
- Densimètre (G-widder).

2.1.2.2. Appareils utilisés pour la préparation du fromage

- Bain marie (MEMMERT) ;
- Four Pasteur (HERAEAEUS) ;
- Réfrigérateur (Binder).

2.1.2.3. Appareils utilisés pour les manipulations microbiologiques

- Microscope optique (Laboscope 200);
- Autoclave (Systec 5075 MLV);
- Incubateur (HERAEAEUS);
- Incubateur agitateur (Heidolph Inkubator 1000) ;

-Centrifugeuse max .10000 tours /min. (Universal 16 R).

2.1.3. Verrerie et petit matériel

Pipettes Pasteur, flacons en verre (de 250 ml), tubes à essais en verre, pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml ...), boîtes de pétri en plastique, béchers de 500 et 1000 ml, des Erlen Myers, tubes à hémolyse en plastique (5ml), micropipette (50 µl), burette, anse de platine, fil droit, mortier, cloches de Durham ...

2.1.4. Réactifs

- Eau physiologique,
- Phénolphtaléine,
- Solution de Soude (1N),
- Bleu de Méthylène,
- Rouge de Méthyle,
- Tampon citrate (2%),
- Tampon tryptone-sel (TS),
- Réactifs pour coloration du GRAM,
- L'eau oxygénée,
- Disques d'oxydase.

2.1.5. Milieux De Culture (annexe 1).

- Milieu M 17(bouillon et gélosé)
- Milieu Gélose Nutritive Ordinaire (GNO)
- Milieu King A
- Milieu King B

- Milieu Muller – Hilton
- Galerie API 20 E (Biomérieux)
- Milieu T.S.I
- Milieu K .I.A
- Milieu Mannitol de Mobilité
- Bouillon Nutritif (BN)
- Bouillon de Clark et Lubs

2.2. Méthodes

Les différentes étapes de la méthodologie suivie dans cette étude sont schématisées sur la figure 5:

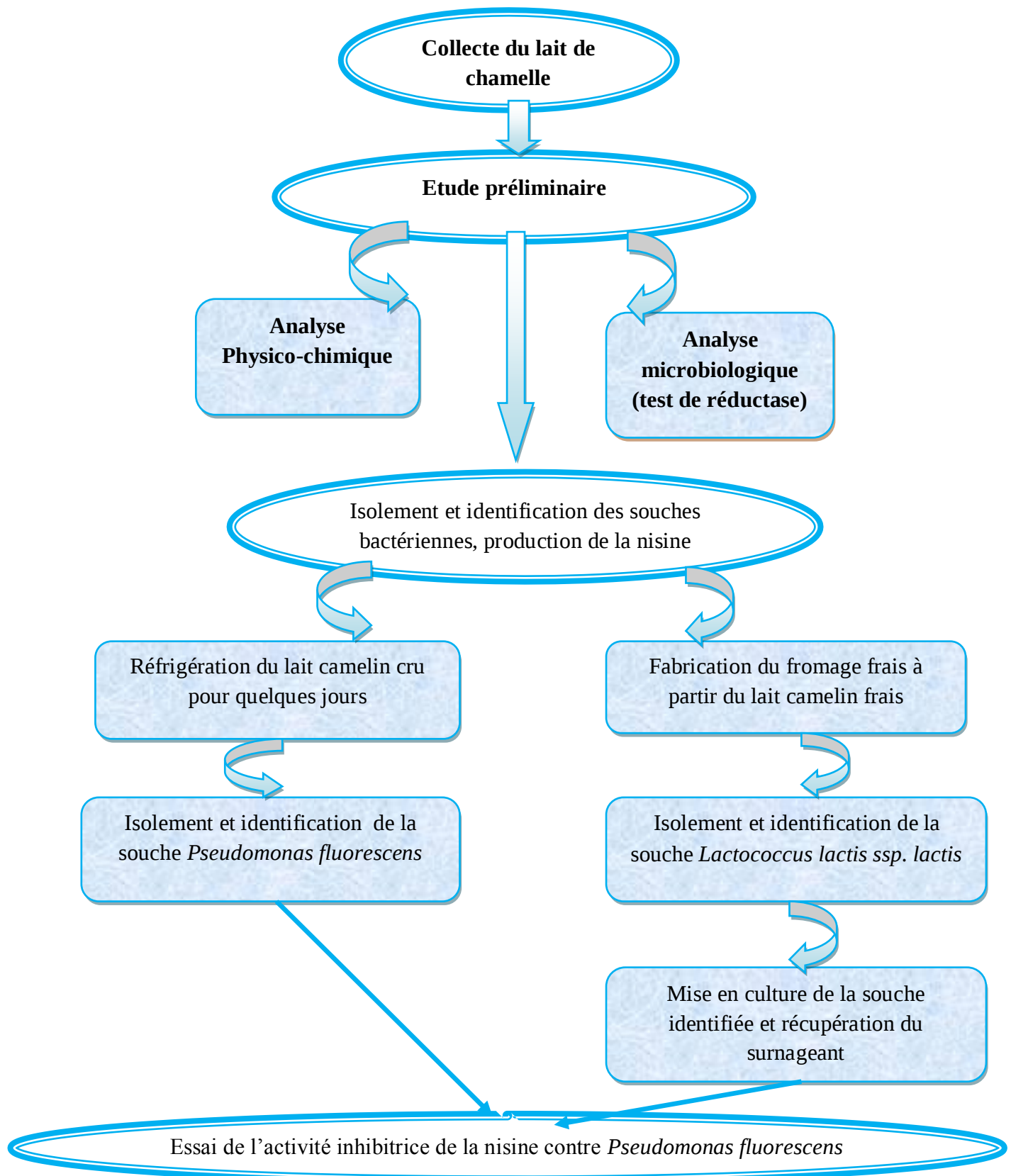


Figure 05: Procédure expérimentale

2.2.1. Analyses physico-chimiques

2.2.1.1. Mesure de l'acidité

Le pH est mesuré à 20°C à l'aide d'un pH-mètre de type (METROHOM 620). Le principe repose sur la mesure directe du pH à l'aide d'une électrode plongée dans un bécher contenant 100 ml du lait. La valeur de pH est lue directement sur l'appareil (**SBOUI et al., 2009**).

L'acidité est dosée par titration avec une solution de NaOH (N/9) et exprimée en ° Dornic (**SBOUI et al., 2009**). Un échantillon précis de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphthaléine, la soude est ajoutée à la burette jusqu'au virage au rose de l'échantillon le degré Dornic correspondant au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaire pour assurer le virage de la phénolphthaléine (**GUIRAUD, 2003**).

2.2.1.2. Densité

La densité est déterminée à l'aide d'un densimètre de type (Gwinder) sur un lait maintenu au repos. Elle consiste à plonger l'appareil dans une éprouvette de 250 ml remplie de lait, lorsqu'il se stabilise, la lecture de la valeur de la densité se fait directement sur l'appareil (**SBOUI et al., 2009**).

2.2.2. Analyse microbiologique du lait

Test de réductase

La population bactérienne du lait peut être indirectement déterminée en ajoutant à l'échantillon à examiner, une quantité connue de bleu de méthylène et en observant le temps requis pour sa décoloration (**GUIRAUD, 2003**).

La durée de la décoloration nous permet de quantifier approximativement la population microbienne du lait et par conséquent d'estimer sa qualité microbiologique (**BERRENS et LUQUET, 1987**). (Tableau VII).

Il s'agit de mettre dans des tubes à essai stériles l'échantillon du lait de chamelle (lait cru), ajouter de bleu de méthylène à (1%), mélanger, et incuber à 37° C.

Tableau VII : Grille d'appréciation de la qualité microbienne du lait (BERRENS et LUQUET, 1987).

Durée de décoloration (heures)	Nombre de germes (germe/ml)	Qualité microbienne du lait
Supérieure à 5 heures	100000 à 200000	Bonne
De 2 à 4 heures	200000 à 2 millions	Bonne à passable
Inférieure à 2 heures	2 à 10 millions	insuffisante

2.2.3. Isolement et identification De la souche productrice de nisine à partir d'un fromage frais camelin

2.2.3.1. Isolement

2.2.3.1.1. Essai de fabrication de fromage camelin frais

Un fromage frais est tout d'abord un fromage que l'on doit consommer assez rapidement après sa fabrication. Il est obtenu par simple coagulation du lait que l'on déclenche par emprésurage et/ou acidification ou par acidification et chauffage. Il est peu égoutté et non affiné. Il peut être salé ou sucré (RAMET, 1993).

La méthode de fabrication utilisée dans le présent travail consiste à utiliser des enzymes gastriques de dromadaire (ECD) comme seul agent de coagulation. Ces enzymes sont extraites à partir de l'estomac d'un dromadaire âgé de 14 mois (BOUDJENAH-HAROUN *et al.*, 2011) et conservées dans un flacon en présence de thymol comme conservateur. La fabrication dure une journée et elle comprend sept étapes décrites dans la figure 6 et sur l'annexe 02.

2.2.3.1.2. Technique d'isolement de la souche productrice de nisine

L'isolement de cette souche d'intérêt à partir du fromage fabriqué au laboratoire avec les ECD, se fait comme suit : un échantillon de fromage de (10 gr) est mélangé avec 90 ml de tampon citrate à 2 %, dans un mortier. Après trituration pendant 3 min. À la température ambiante, la suspension mère obtenue est utilisée pour réaliser des dilutions décimales successives dans le même tampon jusqu'à une dilution 10^{-8} , dilution nécessaire pour l'isolement bactérien (EDIMA, 2007).

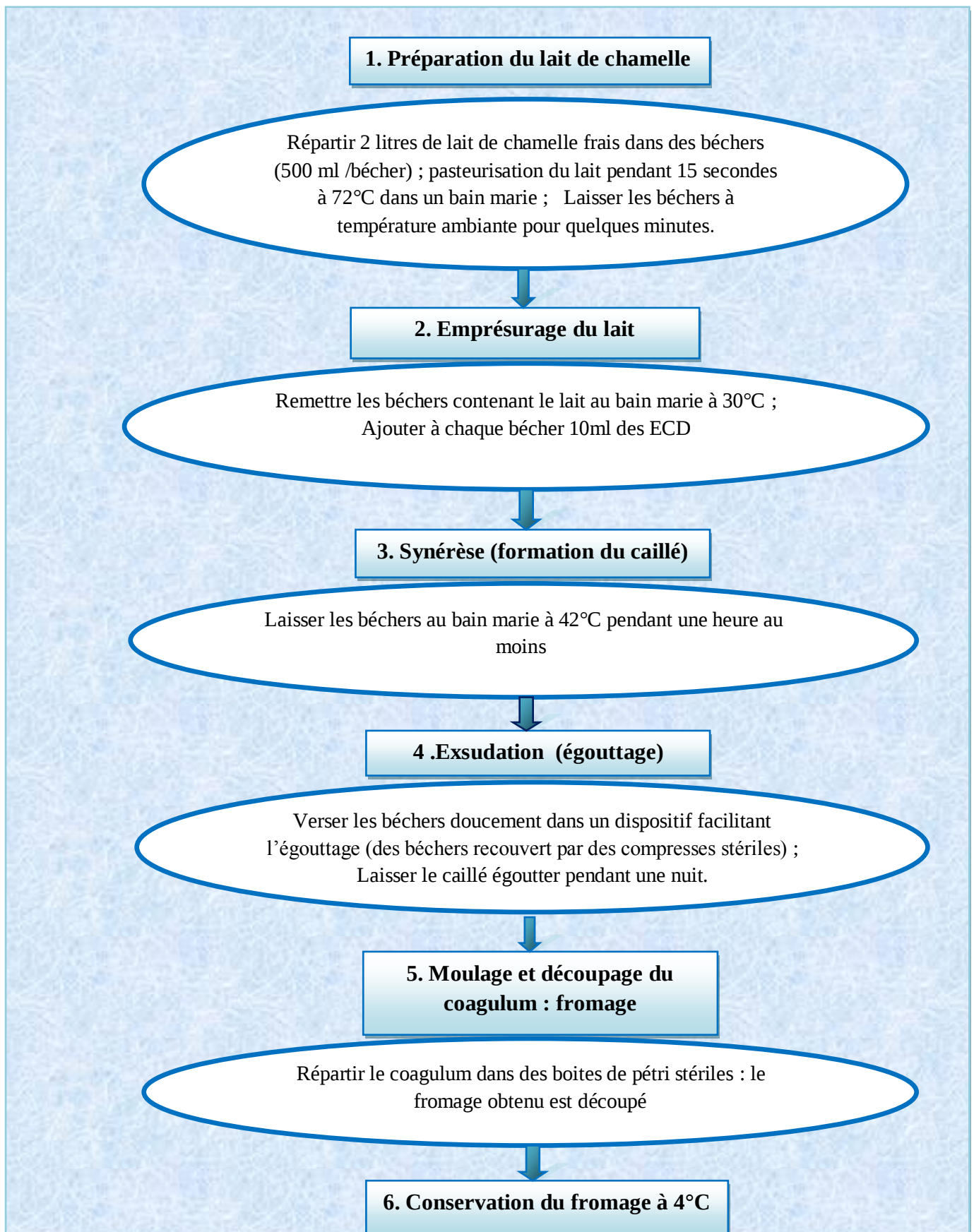


Figure 6 : Fabrication du fromage camelin frais

Le milieu glucosé tamponné ou le bouillon M17 convient généralement bien pour la culture en milieu liquide des lactocoques. Quelques gouttes de la dilution 10^{-8} sont prélevées à l'aide de l'anse de platine et sont ensemencées en stries d'épuisement, à la surface d'une boîte de pétri contenant de la gélose M17; l'incubation se fait à température de 30° C pendant 24 heures (**GUIRAUD, 2003**).

2.2.3.2. Identification biochimique de la souche *Lactococcus lactis ssp. lactis*

A partir d'une culture sur M 17 gélosé (incubée 24 h / à 30°C) on réalise des repiquages successifs de la souche à identifier sur le même milieu gélosé pour assurer sa purification. L'identification biochimique de la souche se fait selon **GUIRAUD** (2003) et **JOFFIN** et **LEYRAL** (2006) par :

- l'examen macroscopique (aspect des colonies sur gélose M17) ;
- l'examen microscopique (après coloration de GRAM) ;
- le test de la catalase ;
- le test de l'oxydase ;
- l'identification classique de la souche selon quelques tests biochimiques (la galerie de Sherman) (selon **JOFFIN** et **LEYRAL**, 2006) ;
- l'étude de type du métabolisme et l'assimilation de quelques sucres (tests T.S.I, K.I.A et mannitol de mobilité) ;
- l'utilisation de quelques tests de la galerie API 20 E.

➤ Examen macroscopique

Il s'agit de décrire l'aspect des colonies à savoir leur forme, leur couleur et leur texture.

➤ Examen microscopique

Cet examen est effectué avec l'objectif 100 à immersion, après la coloration double de GRAM .Il sert à classer la souche (GRAM + ou -) et à déterminer la forme unitaire des cellules ainsi que leur mode d'enchaînement (**GUIRAUD, 2003**) (annexe 3).

➤ Test de la catalase

La catalase est une enzyme produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme

respiratoire qui détruit le peroxyde d'hydrogène et libère de l'oxygène (VÉZINA et LACROIX, 2000). La mise en évidence d'une catalase se fait par contact de la culture microbienne avec une solution fraîche d'eau oxygénée (GUIRAUD, 2003).

➤ **Test de l'oxydase**

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire (cytochrome C oxydase) en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C. Sur un papier filtre stérile, déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyle-para-phénylène diamine, humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile, à l'aide d'une pipette pasteur, on prend une partie de la culture de la bactérie à identifier (culture de 18 à 24h) et on la dépose sur le disque. La lecture se fait après 30 secondes, la réaction est considérée comme positive si on remarque la présence d'une coloration rose pâle à violet. L'absence de coloration signifie une réaction négative (VÉZINA et LACROIX, 2000).

➤ **Identification par la galerie de Sherman**

- **Culture à 45°C**

Ce test est réalisé en ensemençant un tube à essai contenant le bouillon M17 à partir d'une culture sur gélose M17, l'incubation dure 24 à 48 h.

La présence des troubles dans le tube indique la présence de culture (on compare avec un tube témoin non ensemenché).

- **Culture en bouillon hypersalé**

Dans un tube à essai contenant le bouillon M17 on ajoute du Na Cl à 6,5 %, la culture se fait par quelques gouttes de suspension bactérienne dense, l'incubation est de 24 h à 37°C.

- **Culture à pH 9,6 (base)**

La même technique que celle du test précédent en remplaçant le chlorure de sodium par du NaOH (1N), la solution de soude ajoutée est préalablement préparée et stérilisée par autoclavage (120°C / 15 min).

➤ **Etude du type du métabolisme et de l'assimilation de quelques sucres**

- **Etude de type de métabolisme**

Pour l'étude de métabolisme on verse le milieu M17 liquide sur des tubes à essai contenant des cloches de Durham et on autoclave les tubes pour 15 minutes à 120°C. L'ensemencement est suivi d'une incubation 24 h à 30 °C.

Le métabolisme oxydatif se traduit par l'absence de gaz et les cloches restent au fond des tubes. Le flottement des cloches signifie la présence des gaz et un métabolisme fermentaire (GUIRAUD, 2003).

- **Test de (Mannitol –mobilité)**

Le Test de (Mannitol –mobilité) est réalisé sur un milieu Mannitol de mobilité, un milieu gélosé semi solide qui permet d'étudier la mobilité d'une souche bactérienne et de tester sa capacité ou non de dégrader le mannitol. L'ensemencement à partir d'une culture sur milieu gélosé, se fait par piqûre centrale du tube à l'aide d'un fil droit, suivie par une incubation pendant 24 h à 30°C.

La transformation du milieu en jaune signifie : Mannitol + ; Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle et aller dégrader le mannitol tout le long du tube (GUIRAUD, 2003).

- **Test de T.S.I (Tri-Sugar-Iron)**

Ce test est réalisé sur un milieu gélosé incliné T.S.I qui permet l'utilisation du lactose, du saccharose, la fermentation du glucose et la production d'H₂S. L'ensemencement des tubes est réalisé sur la pente et par pique en culot à partir d'une culture sur milieu gélosé. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

- **Test de Hajna-Kligler (K.I.A)**

Le test de Hajna-Kligler se fait sur milieu gélosé incliné qui permet l'utilisation du lactose, fermentation de glucose et la production d'H₂S.

L'ensemencement est sur la pente et par pique en culot à partir d'une culture sur milieu gélosé, l'incubation se fait à 30°C pendant 24h (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

➤ **Identification par la galerie API 20 E**

Le principe consiste à identifier les microorganismes par leur capacité à fermenter des sucres, critère de différenciation des espèces. Cette micro galerie est utilisée pour l'identification des entérobactéries, on l'utilise dans cette étude pour quelques tests comme :

- **ADH (arginine déshydrolase)**

Le test arginine déshydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine par l'arginine déshydrolase, la réalisation de test se fait comme de la manière suivante :

A l'aide d'une pipette de Pasteur, on inocule la cupule de l'API 20 E contenant l'arginine déshydratée avec l'inoculum de la bactérie à identifier (préparé à partir d'une culture de 18 à 24 h avec de l'eau physiologique), on ajoute quelques gouttes d'huile minérale stérile, on incube à 30°C pendant 24 à 48 h. A la suite de l'incubation, on lit la réaction obtenue :

-réaction positive : si le milieu demeure rose

-réaction négative : si le milieu devient jaune orangé (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

- **CIT (recherche de la citratase)**

C'est un examen qui affirme l'utilisation de citrate par les bactéries comme seule source de carbone et d'énergie, ce milieu est identique à celui de citrate de Simmons (milieu gélosé), l'ensemencement se fait en remplissant la cupule l'inoculum de la bactérie à identifier, l'incubation de la galerie se fait à 30°C/24- 48 h pour la lecture de test :

- Réaction positive : couleur bleu ou vert bleu

- Réaction négative : couleur jaune (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

- **GEL (hydrolyse de la gélatine)**

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'une protéase hydrolysant la gélatine de l'API 20 E (gélatine agglomérée avec du carbone). L'hydrolyse de la gélatine peut être étudiée sur milieu gélatiné en culot, milieu de Kohn ou sur la cupule GEL de la galerie API 20 E (GUIRAUD, 2003). L'ensemencement se fait en remplissant la cupule l'inoculum de la bactérie à identifier. L'inoculum est préparé à partir une partie de la culture de la souche à étudier avec 10ml d'eau physiologique, l'incubation de la galerie se fait à 30°C/24- 48 h, Pour la lecture :

- Réaction positive : une suspension noire dans la cupule ;

- Réaction négative : les particules de gélatine restent agglomérées au fond de la cupule

(JOFFIN et LEYRAL, 2006).

2.2.4. Production de nisine à partir de culture de *Lc.lactis ssp. Lactis*

Le protocole de production utilisé s'inspire de ceux réalisés par plusieurs auteurs (BAREFOOT *et al*, 1983 ; LACHANCE, 2000 ; SEBTI,2002 ; XIA LIU *et al*, 2003 ; DOUMANDJI *et al*, 2010). La production de nisine commence par une pré-culture de la souche *Lc.lactis ssp. lactis*, souche précédemment isolée. Tout d'abord, la pré-culture est obtenue en

ensemencant des tubes à essai stériles contenant 9 ml de bouillon M17 avec 1 ml d'une culture de plus de 24h de la souche *Lc.lactis ssp. Lactis* isolée à partir du fromage au lait camelin fabriqué au laboratoire, dans le même bouillon. Les tubes sont incubés à 30 °C avec agitation à 140 rpm pendant 18 h dans un incubateur agitateur.

Pour faciliter la diffusion de la bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* on utilise le milieu M17. 100 ml de ce milieu sont réparti en deux Erlenmeyers (de 100 ml), enrichis en glucose à 1% et stérilisés pendant 20min à 120°C. Ensuite, le milieu M17 estensemencé à 10 % par de la pré-culture de *Lc.lactis ssp. lactis*, cette culture est incubée pendant 18 à 24 h à 30°C avec agitation à 140 rpm. Pour la récupération du surnageant, la culture bactérienne est répartie dans des tubes à hémolyse (de 5 ml) et centrifugé à 8000 g pendant 20 min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée (UNIVERSAL R16), le surnageant est récupéré soigneusement avec élimination des cellules bactériennes rassemblées en fond des tubes. Pour éliminer l'effet des acides organiques, le pH de le surnageant obtenu est ajusté à 6 avec une solution de NaOH (1N). La figure 7 représente les principales étapes de production de la nisine à partir d'une culture de *Lc.lactis ssp lactis* :

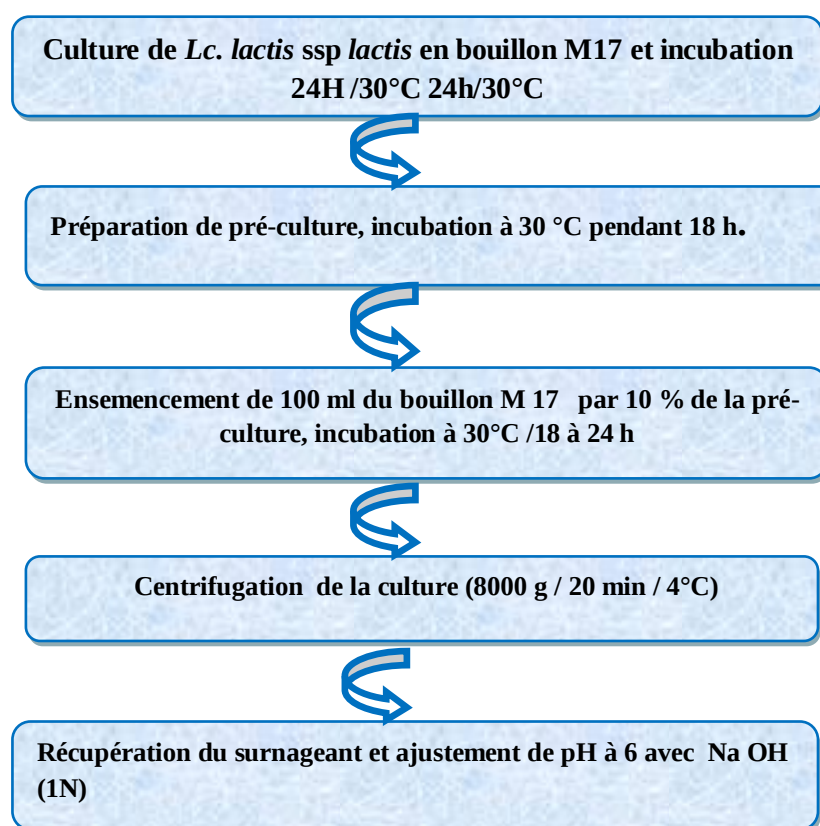


Figure 7 : Production de nisine à partir de culture de *Lc.lactis ssp.lactis*.

2.2.5. Isolement et identification de l'espèce indicatrice

2.2.5.1. Isolement

L'isolement de *Pseudomonas fluorescens* à partir du lait camelin réfrigéré se fait sur gélose nutritive après incubation à 7°C pendant 10 jours (MILLIERE et VEILLET-PÜNCET, 1979). Le milieu gélosé est réparti en boîtes de pétri etensemencé en surface par quelques gouttes du la dilution 10^{-3} du lait. Le diluant utilisé est un tampon tryptone –sel (TS) (GUIRAUD ,2003).

2.2.5.2. Identification

Les colonies apparues sur GNO sont examinées macroscopiquement. L'examen à l'état frais (examen de mobilité) et après coloration de GRAM doit être observé sous microscope optique ($\times 100$) (GUIRAUD, 2003).

➤ Culture sur King A et King B

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B permettent de différencier entre elles les différentes espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques, pyocyanine sur King A et pyoverdine sur King B (GUILLAUME ,2004).

L'ensemencement des milieux King A et King B gélosés coulés en boîtes de Pétri et en tubes inclinés se fait à partir d'une culture de la souche à identifier sur GNO (après quelques repiquages successifs) par des stries en surface des milieux. L'incubation se fait au moins pour 24h à 30°C et en aérobiose.

➤ Métabolisme des glucides (tests K.I.A et T.S.I)

L'incubation de ces milieux se fait en aérobiose (la technique d'ensemencement est déjà mentionnée).

➤ Test de rouge de méthyle (RM)

Le test au rouge de méthyle présente un intérêt dans l'identification bactérien ; il permet de préciser l'évolution du pH en milieu glucosé, ce test est réaliser en utilisant le milieu Clark et Lubs (bouillon réparti dans des tubes standards), l'ensemencement se fait à partir d'une culture sur GNO, l'incubation à 30°C /24 h est suivie par l'ajout d'une à deux gouttes de RM avec lecture immédiat du test :

- réaction positive : la coloration rouge montre un milieu relativement acide, la bactérie est dite RM+.

- Réaction négative : la coloration jaune montre un milieu légèrement acide ou alcalin, la bactérie est dite RM- (JOFFIN ET LEYRAL, 2006).

➤ **Test de la catalase (GUIRAUD ,2003).**

➤ **Test de l'oxydase (VÉZINA et LACROIX, 2000).**

➤ **Croissance à 4°C et 43°C**

Des tubes à essai stériles contenant le bouillon nutritif (BN) sont ensemencés à partir d'une culture de la souche à identifier sur GNO, l'incubation se fait en aérobiose pendant 24 h.

La présence des troubles dans les tubes indique la croissance bactérienne (GUIRAUD ,2003).

➤ **API 20 E**

On utilise la galerie API 20 E pour réaliser les deux tests:

- **GEL (Gélatinase)**
- **ADH (arginine déshydrolase)**

Le test arginine déshydrolase est réalisé sur milieu semi-liquide d'ARGININE ou sur la cupule ADH de la galerie API 20E (VÉZINA et LACROIX, 1998).

2.2.6. Etude de l'activité inhibitrice de la nisine sur *Pseudomonas fluorescens*

L'activité antimicrobienne du surnageant récupéré à partir de culture de la souche *Lactococcus lactis subsp. lactis* est testée selon plusieurs méthodes de diffusion sur gel préconisée par TAG et al. (1976). Elle est fondée sur l'apparition d'une zone d'inhibition, provoquée par les surnageants de cultures, contenant les bactériocines, déposés dans des puits, des spots ou même imbibés sur des disques. Les bactéries indicatrices sont préalablement ensemencées, en tapis, en Milieu gélosé approprié.

2.2.6.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum de la souche test (*Pseudomonas fluorescens*) est préparé dans des tubes à essai stériles on inoculant 5 ml d'eau physiologique stérile avec une colonie de la souche test prise de GNO.

2.2.6.2. Méthode des puits

Trois boîtes de pétri contenant le milieu Mueller-Hilton (MHA) sont inoculées par la germe cible (*Pseudomonas fluorescens*). Sur chaque boîte on creuse des puits en utilisant

l'extrémité d'une pipette de Pasteur stérile (diamètre de 4,5 mm). Les puits sont remplis par la suite, par 50 µl de surnageant bactériocinique. Les boîtes de pétri ainsi préparées sont pré-incubées pendant 2 à 4 heures à + 4 °C, afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur. Une incubation s'effectue alors à 30 °C pendant 18 à 24 heures, en aérobiose. L'effet antibactérien de la nisine est mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du puits. La lecture de l'activité bactériocinogénique se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits (Zi), exprimée en mm (**ALLOUACHE** et al, 2010).

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm **THOMPSON** et al, (1996) cité par **DOUMANDJI** et al (2010). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

$$\text{Zi en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (4,5 mm)}$$

2.2.6.3. Méthode des spots

Trois boîtes de pétri contenant le milieu Mueller-Hilton sont inoculées par les germes cibles et laissées sécher sous flux d'air pendant 15 min. Des gouttes de 10 µl de la surnageant à tester sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une micropipette. Les boîtes sont étuvées pendant 18 à 24 h à 30°C.

Le résultat recherché se manifeste par la présence de zones d'inhibition claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la souche cible (**IZQUIERDO**, 2009).

2.2.6.4. Méthode des disques imprégnés

Elle consiste selon **TADESSE** et al, (2004) à :

- Inonder en surface les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hilton par l'inoculum de la souche cible,
- Laisser sécher les boîtes pendant 30 min à 30°C, après séchage, déposer à la surface de la gélose des disques en papier buvard stérile préalablement imprégnés par le surnageant bactériocinique, ensuite sécher encore une fois les boîtes pendant 30 min,
- Mettre les boîtes à 4°C pendant 4h pour assuré la diffusion de la bactériocine, enfin incubé les boîtes à 30°C pendant 24h.

L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré en mm.

2.2.6.5. Mesure de l'activité antibactérienne en unité arbitraire (UA /ml)

Il s'agit d'un titrage réalisé selon le test de la dilution critique : une série de dilution en cascade au ½ de la surnageant à tester est effectuée en eau distillée stérilisée. Une goutte de 10 µl de chaque dilution est déposée sur un endroit précis dans la boîte de Pétri (4 spots pour chaque boîte) contenant l'inoculum de la souche cible préparée comme indiquée précédemment. Les boîtes sont incubées pour 18 à 24 h à 30°C. L'activité antibactérienne en unité arbitraire par ml (UA / ml) est déterminée selon **CHAMPAGNE** (2007) par le nombre d'unités arbitraires dans la préparation initiale est calculé à partir de la plus grande dilution (D) où il y a encore la présence d'une zone d'inhibition de plus de 2 mm, selon l'équation suivante:

$$A \text{ (UA / ml)} = (1000 / 10 \text{ } \mu\text{l}) \times (I/D)$$

VI. Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

3.1. Analyses physico-chimiques et microbiologiques

3.1.1. Analyses physico-chimiques

Le tableau VIII regroupe les résultats relatifs aux caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle analysé. Le résultat représente la moyenne de trois répétitions.

Tableau VIII : Analyses physico-chimiques de l'échantillon de lait camelin

Paramètres	valeur moyenne	Ecart type
pH à (T° =18 ,2°C)	6 ,546	± 0.002
Acidité (°D)	17,5	± 0.500
Densité	1 ,025	± 0.001

3.1.1.1. pH

Le pH de l'échantillon de lait camelin ayant fait l'objet de la présente étude est égal à 6 ,546 . Le lait de chamelle à l'état frais est plus acide et moins dense que les laits, bovin et humain dont les valeurs du pH sont respectivement égales à 6,6 et 7,01 (SBOUI *et al.*, 2009).

Plusieurs auteurs ont révélés des valeurs de pH de lait de chamelle différentes de notre résultat. Parmi ces auteurs, on peut citer, MAHBOUB *et al.* (2010) à Ouargla et KIHALL *et al.* (1999) à BECHAR, qui ont enregistré des valeurs de pH supérieures soient $6,65 \pm 0,132$ et $6,57 \pm 0,32$, respectivement. En revanche, SBOUI *et al.* (2009) en Tunisie, SIBOUKEUR (2005) à Ouargla et SAWAYA *et al.* (1984) en Arabie Saoudite ont trouvés des valeurs de pH inférieures, soient 6,41 , $6,31 \pm 0,15$ et $6,49 \pm 0,024$, respectivement.

Le pH ainsi que le goût du lait de chamelle peuvent dépendre de la nature des fourrages et de la disponibilité de l'eau (GORBAN et IZZELDIN ,1997). De plus, La teneur relativement élevée en vitamine C du lait de dromadaire, est à l'origine du pH bas comparé au lait bovin (SALEY, 1993). Il a été montré que le pH bas du lait camelin est dépendant de la teneur en citrates, phosphates et caséines, ainsi, que de l'état sanitaire de la mamelle (MATHIEU, 1998).

3.1.1.2. Acidité

Le lait fraîchement trait est légèrement acide. Cette acidité provient essentiellement, des protéines, des phosphates et du CO₂ dissous. Il acquiert ensuite une acidité, dite acidité développée

car elle est provoqué par l'acide lactique et autres acides issus de la dégradation par des micro-organismes (**BADAoui, 2000**).

L'acidité mesurée au cours de cette étude est égale à 17,5 °D, elle est comparable à celle obtenue par **SBOUI et al.** (2009) en Tunisie qui est égale à 17,2°D et par **MAHBOUB et al.** (2010) à Ouargla qui est de l'ordre de $21,3 \pm 1,44$ °D.

Les variations dans la valeur l'acidité sont généralement dues à la variation de l'alimentation des animaux, aux conditions environnementales ainsi qu'à la période de lactation (**ABU-TARBOUSH, 1996**).

De plus, le lait de chamelle possède un effet tampon plus élevé par rapport au lait bovin (**ABU-TARBOUSH, 1996**). En effet, l'acidité titrable de ce lait varie relativement peu par rapport à l'élévation du pH.

3.1.1.3. Densité

Le taux de matières sèches du lait camelin est plus faible que celui du lait bovin (**KAMOUN, 1989**). Ce qui explique la faible densité enregistrée dans la présente étude et qui est de l'ordre de 1,025. Similaire à celle obtenue par **SBOUI et al.** (2009), elle est inférieure à celles rapportées pour le lait de vache (de 1,028 à 1,035) (**VIGNOLA et al., 2002**).

3.1.2. Qualité bactériologique de lait camelin

L'épreuve de la réductase n'est pas un moyen d'appréciation du nombre des bactéries mais une épreuve destinée à estimer le degré de la contamination du lait (**PETRANSEXIENE, 1981**).

La décoloration du bleu de méthylène par le lait de chamelle analysé a eu lieu après une durée supérieure à 4 heures. Ce lait est par conséquent de bonne qualité bactériologique. Il renferme moins de $2 \cdot 10^6$ germes /ml (**LARPENT, 1970 ; GUIRAUD ,1998**). La décoloration du bleu de méthylène est due au métabolisme bactérien et sa rapidité est directement proportionnelle au nombre de germes. En effet le lait cru contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 50 000 germe/ml et moins de 1 coliforme / ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores, comme les microcoques, les streptocoques lactiques, les lactobacilles et peu de germes contaminants. D'autres germes peuvent être présents dans le lait notamment lorsqu'il est issu d'un animal malade (agents de mammite, etc.). Le lait peut également être contaminé au cours

de la traite et des diverses manipulations, par une multitude de micro-organismes. Ainsi la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variable (**LARPENT, 1997**).

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

3.2. La fabrication du fromage camelin

A partir de 2 litres de lait de chamelle cru, nous avons produit 710 grammes de fromage frais avec un rendement de 35,5%. Ce fromage dont l'aspect général est proche de celui du fromage au lait de vache, possède les caractéristiques organoleptiques suivantes :

- il est de couleur jaune paille ;
- il est mou ;
- il présente une légère amertume.

Ces résultats montrent que le fromage fabriqué au laboratoire, diffère de celui décrit par **RAMET (1989)**. L'auteur a caractérisé le coagulum comme étant friable et les rendements rapportés sont de l'ordre de 8 à 10 % pour les fromages frais (**RAMET, 1989**). La friabilité augmente énormément les pertes en matière sèche dans le lactosérum ce qui diminue les rendements fromagers. L'auteur conclut après de nombreux essais de fabrication que l'aptitude fromagère du lait de chamelle est satisfaisante sous réserve de modifier certains paramètres technologiques destinés en particulier à renforcer la fermeté des gels.

Dans le même contexte, des expérimentations conduites en Arabie Saoudite (**RAMET, 1985**) et en Tunisie (**RAMET, 1987**; **KAMOUN et RAMET, 1988**) montrent que les difficultés rencontrées lors de la fabrication du fromage au lait de chamelle peuvent être contournées en partie par des adaptations technologiques adéquates.

Au cours de ce travail, la substitution de la présure habituellement utilisée en fromagerie par des enzymes coagulantes extraites à partir des caillettes de dromadaires (ECD), au niveau des laboratoires de l'université KASDI MERBAH à Ouargla, a permis une nette amélioration de la texture et du rendement fromager de ce produit dérivé. En effet, les travaux réalisés en Egypte par **EL-ABASSY (1987)** et **EL-BATAWY et al. (1987)** avaient préconisé l'utilisation de la pepsine de dromadaire pour produire une préparation coagulante dans des conditions acceptables d'activité

et de stabilité. Plus récemment, l'efficacité des protéases gastriques issues de caillettes de dromadaires adultes donc à dominance pepsine a été prouvée par **SIBOUKEUR *et al.* (2005)**, et par **BOUDJENAH *et al.* (2011)**.

3.3. Identification de la souche productrice de nisine isolée à partir du fromage camelin

Les souches isolées produisent sur milieu M17, des colonies de forme irrégulière, de couleur blanche à crème, avec une surface lisse et muqueuse et un pourtour irrégulier (photo 1). L'examen microscopique révèle que les souches testées sont GRAM positif, de forme coccoïde, réparties en paires ou en chaînettes. Les résultats des examens microscopiques et macroscopiques de la souche isolée sont illustrés sur le tableau (IX) :

Tableau IX : Examens microscopique et macroscopique de la souche isolée

Examen macroscopique	forme des colonies	ronde et irrégulière
	couleur des colonies	blanchâtre à jaunâtre (beige)
	aspect des colonies	Muqueux
Examen microscopique	détermination du GRAM	GRAM +
	forme unitaire	coques de petite taille
	Mode de rassemblement	en paires ou en chaînettes

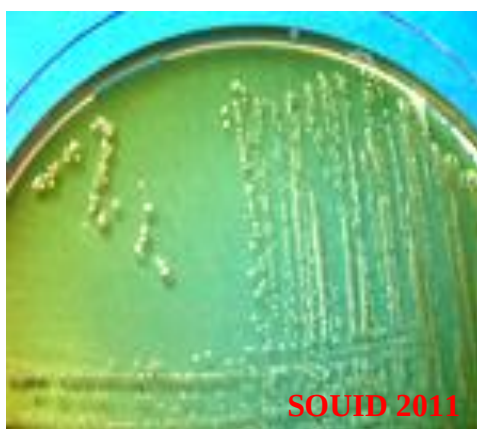


Photo 1 : Culture bactérienne sur milieu M17

L'identification de la souche isolée est réalisée par des tests biochimiques et physiologiques classiques (tableau X) et à l'aide de quelques tests de la galerie API 20 E (photo 2).

La souche isolée est dénuée de catalase et d'oxydase. Elle est immobile. Elle fermente le glucose en donnant seulement de l'acide lactique (homofermentaire). Elle n'hydrolyse ni l'arginine ni le citrate. Elle croît à pH 9,6 et résiste à 45° C (tableau X).

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques ont permis d'identifier la souche isolée comme étant une souche appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (GUIRAUD, 2003). La même souche a été identifiée par SAÏDI (1998) et KACEM (2003) à partir de laits crus de vaches produites dans la région de l'Ouest Algérien et par ZADI- KARAM (1998) dans le lait de chamelle. Une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* productrice de nisine a été également isolée à partir d'un fromage à base de lait bovin (MEGHROUS, 1998).

Cependant, cette souche capable de croître à pH de 9,6 est différente de celle isolée par MUNDT (1986), SCHLEIFER (1987) et HASSAÏNE *et al.* (2007), qui n'a pas montré cette capacité. Cela peut sans doute s'expliquer par une sélection due à l'environnement naturel de la bactérie, c'est-à-dire le lait de chamelle. En effet, le régime alimentaire influe sur la composition chimique et microbiologique du lait camelin (MOSLAH, 2002).

L'espèce *Lactococcus lactis* joue un rôle important dans la conservation de nombreux aliments et dans la fabrication des fromages et des produits fermentés. En effet, les lactocoques sont généralement associés à une forte capacité d'acidification du lait. Elles présentent aussi des propriétés inhibitrices envers la flore d'altération et envers la flore pathogène du fromage, grâce à la production de métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines ou à sa compétition écologique vis-à-vis des nutriments (O'SULLIVAN *et al.*, 2002 ; DORTU *et al.*, 2009).

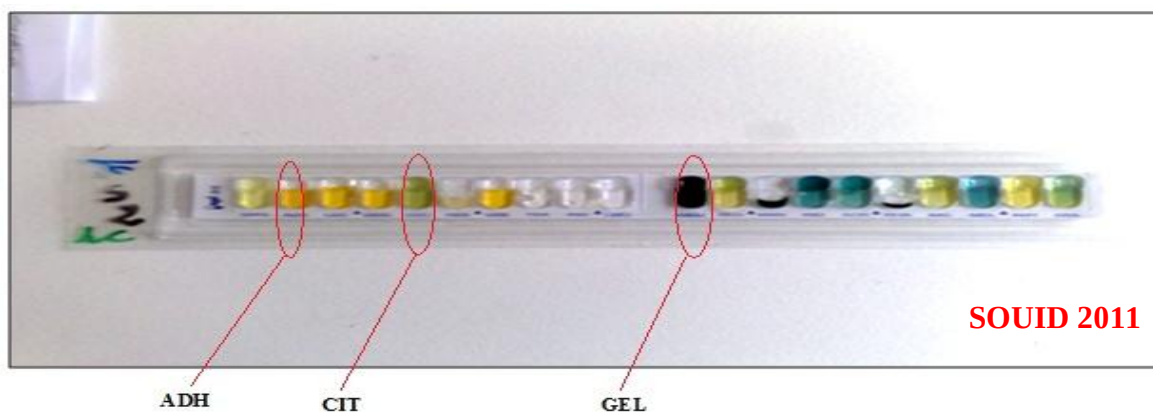


Photo 2: Identification de la souche isolée par la galerie biochimique API 20 E.

Tableau X : Identification par les tests biochimiques et physiologiques

Test		Résultats
catalase		-
oxydase		-
croissance à 45°C		+
croissance à 6,5 % de Na Cl		-
croissance à pH 9,6		+
type de métabolisme		fermentaire (homofermentaire)
mannitol de mobilité		mannitol (+), mobilité (-)
T.S.I		lactose (+), glucose (+), aéro-anaérobie, saccharose (+/-)
K.I.A		fermentation de glucose (+), lactose (+)
API 20 E (après 48 h d'incubation)	ONPG	+
	ADH	-
	LDC	-
	ODC	-
	CIT	-
	H ₂ S	-
	Urée	-
	TDA	NR
	IND	NR
	VP	NR
	GEL	+
	GLU	+
	MAN	+
	IND	-
	SOR	-
	RHA	-
	SAC	-
	MEL	+
	AMY	+
	ARA	+

NR : test non réalisé

3.4. Identification de la souche indicatrice isolée à partir du lait camelin réfrigéré

Les colonies apparues sur GNO après 48 heures d'incubation présentent une coloration blanche et un aspect muqueux. Leur diamètre se situe entre 1 et 2 mm (photo 3). Les résultats relatifs à l'examen microscopique à l'état frais (mobilité) et après coloration de GRAM sont indiqués dans le tableau XI.

Tableau XI : Examens préliminaires de la souche indicatrice isolée

Examen macroscopique	forme des colonies	Ronde, régulière
	couleur des colonies	Blanche
	aspect des colonies	Muqueux
Examen microscopique	détermination du GRAM	GRAM -
	forme unitaire	Bâtonnet long
	disposition des bactéries	Isolées
	Examen à l'état frais ($\times 100$)	Bactéries très mobiles

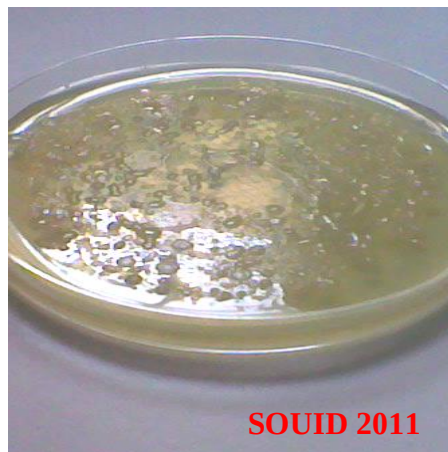


Photo 3: Culture bactérienne sur milieu GNO

Les résultats des tests biochimiques et physiologiques de l'identification sont reportés dans le tableau XII.

La souche isolée à partir du l'échantillon du lait réfrigéré pousse bien sur gélose nutritive ordinaire (annexe 1). Ce milieu non sélectif permet la culture des bactéries peu exigeantes (GUILLAUME, 2004 ; GUIRAUD, 2003).

La culture apparait sous forme de colonies rondes de petite taille, de couleur blanche et d'un aspect muqueux. Les bactéries sont GRAM (-). Elles sont très nombreuses et douées d'une mobilité flagellaire visible sous microscope optique à grossissement ($\times 100$).

La souche isolée est catalase positive, oxydase positive, ne réagit pas avec le rouge de méthyle (réaction RM négatif). Elle dégrade le glucose, l'amygdalosite, l'arabinose et le mélibiose, en aérobie sur la galerie biochimique API 20 E (photo 4). Elle hydrolyse également

l'arginine et la gélatine sur la même galerie. La croissance sur bouillon nutritif (BN) est enregistrée à température de 4°C et pas à 41°C. La production de pyoverdine (pigment) est visualisée sur milieu King B (couleur verte fluorescente) (photo 6).

Les caractères morphologiques et les différents tests biochimiques et physiologiques permettent d'identifier la souche isolée comme étant une souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (GUIRAUD, 2003). Ce résultat est confirmé par la production de la pyoverdine sur milieu King B (KING *et al.*, 1954) (photo 6). La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate de milieu King B (GUILLAUME, 2004).

Parmi les bactéries GRAM négatives qui constituent la flore psychrotrophe dominante du lait cru réfrigéré, le genre *Pseudomonas* occupe la première place (LECLERC, 1961 ; BUSSE, 1965 ; BOCKELMAN, 1969). Dans ce genre, le groupe des fluorescents prédomine. L'espèce *Ps. fluorescens* est la principale espèce psychrotrophe caséolytique du lait cru et 95 % des souches de cette espèce, étudiées par SAMAGH et CUNNINGHAM (1972) liquéfient la gélatine et produisent une protéolyse sur le lait écrémé, aux basses températures.

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont dotées d'une grande activité métabolique (Protéolyse, lipolyse et la dégradation des substances carbonées) (THIERRY, 1997). THOMAS et THOMAS, en 1973, montraient que 51 à 97 % des souches psychrotrophes isolées de laits crus sont fortement protéolytiques et SCHULTZE et OLSEN(1970) rapportent que 90 % des cultures de bactéries psychrotrophes isolées de laits ou de produits laitiers sont soit protéolytiques, soit lipolytiques et que 66 % possèdent ces deux activités.

En plus des différentes sources de contamination, telles que le sol, l'eau et la nourriture, la prédominance de genre *Pseudomonas* dans le lait est liée à l'état sanitaire de l'animal et de l'équipement laitier (MILLIERE et VEILLET-PONCET, 1972).

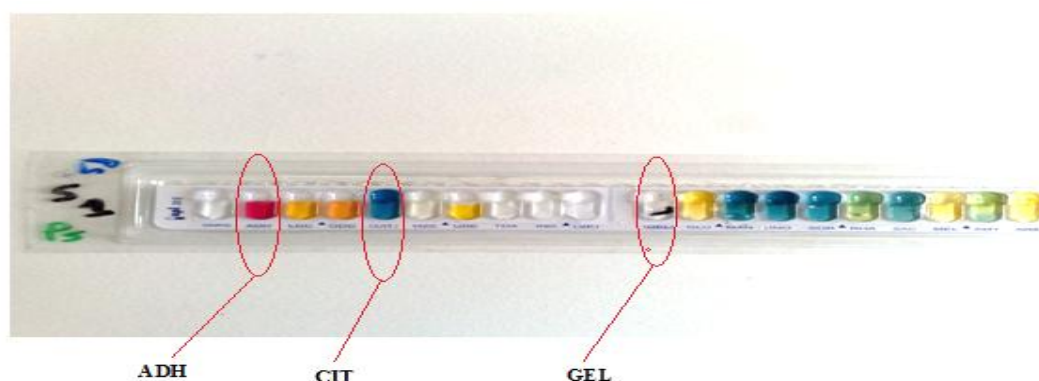


Photo 4 : Identification de la souche indicatrice par la galerie biochimique API 20 E.

Tableau XII : Identification de la souche indicatrice par les tests biochimiques et physiologiques

Test		Résultats
catalase		+
oxydase		+
RM		-
Croissance à 4°C		+
Croissance à 41°C		-
Production de pigmentation sur King A		-
Production de pigmentation sur King B		+ (pyoverdine)
API 20 E (après 24 h d'incubation)	ONPG	-
	ADH	+
	LDC	-
	ODC	-
	CIT	+
	H ₂ S	-
	Urée	-
	TDA	NR
	IND	NR
	VP	NR
	GEL	+
	GLU	+
	MAN	-
	IND	-
	SOR	-
	RHA	-
	SAC	-
	MEL	+
	AMY	+
	ARA	+



Photo 5 : culture bactérienne sur
King A



Photo 6: culture bactérienne sur
King B

3.5. Production de la nisine et étude de l'activité antibactérienne de la nisine sur la souche *Pseudomonas fluorescens*

La souche purifiée *Lactococcus lactis ssp.lactis* à partir du fromage frais de lait camelin est testée pour la production d'une substance antibactérienne autre que les acides organiques : la nisine. Le surnageant de la culture bactérienne productrice de nisine est utilisé afin d'étudier son effet antagoniste vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas fluorescens*, isolée à partir de lait camelin réfrigéré. Cette technique est préconisée par **TAGG** et **MCGIVEN** (1971).

Dans le but de tester *in vitro*, l'effet inhibiteur du surnageant de culture de la souche nisinogène *Lactococcus lactis ssp.lactis* vis-à-vis la souche *Pseudomonas fluorescens* isolées respectivement, à partir du fromage camelin et du lait camelin réfrigéré, trois méthodes de diffusion sur gel sont utilisées.

Après avoir éliminé l'influence de l'acide lactique par neutralisation du surnageant, l'activité antimicrobienne due à l'action de la nisine a révélé une action inhibitrice vis-à-vis du germe cible: *Pseudomonas fluorescens*. Ce résultat est mis en évidence par les trois techniques de diffusion sur gel en boîtes de pétri : la technique des spots, la technique des disques imprégnés de surnageant et la technique des puits. Les résultats obtenus sont illustrés par les photos 7, 8 et 9.

L'effet antimicrobien du surnageant de culture neutralisé (SCN), bactéricide issu de *Lactococcus lactis* a été démontré par plusieurs auteurs. Dans le même contexte, **DIOP et al.** (2009) ont montré un effet positif d'un SCN, issu d'une souche de *Lactococcus lactis ssp .lactis* pour la conservation des poissons au Sénégal. La souche cible *Pseudomonas fluorescens*, produit un tapis bactérien de couleur vert fluorescent du à la production de pyoverdine sur milieu Mueller-Hinton (MHA), La gélose Mueller-Hinton est un milieu destiné à la réalisation d'antibiogrammes par diffusion. Sa composition permet la croissance des bactéries non exigeantes (**GUILLAUME**, 2004).

Ainsi, l'activité antibactérienne du SCN de la souche *Lactococcus lactis ssp.lactis* vis-à-vis *Ps. fluorescens* a été mise en évidence par les trois méthodes utilisées. L'inhibition se traduit par la formation de zones claires (Zi) de diamètres différents selon la technique utilisée. La mesure de diamètres moyens des zones d'inhibition (Zi) est présentée sur le tableau XIII pour les deux techniques (techniques des disques et des puits) :



Photo 7 : Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis *Ps. fluorescens* par la méthode des spots.



Photo 8: Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis *Ps. fluorescens* par la méthode des disques.

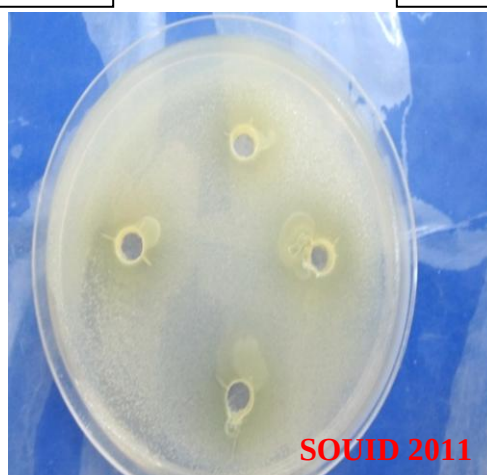


Photo 9 : Activité antibactérienne du SCN vis-à-vis *Ps. Fluorescens* par la méthode des puits.

Tableau XIII : Mesure de diamètres moyens des zones d'inhibition (Zi) pour la technique des puits et des disques

Technique	Diamètres moyens des zones d'inhibition (Zi) en (mm)	Ecart-type
Méthode des puits (*)	8,75 (pour 4 puits positifs)	$\pm 0,030$
Méthode des disques	20,05 (pour 10 puits positifs)	$\pm 0,022$

(*) : Diamètre des puits est égale à 6 mm.

Les 3 méthodes donnent des résultats positifs avec apparition des zones d'inhibition bien distinctes (halos clairs) autour, des spots, des puits et des disques.

Les (Zi) ont des diamètres variables. Ces derniers se situent entre 9 et 18 mm avec une moyenne de 8,75 mm (> 2 mm), obtenue par la technique des puits à partir de 4 puits considérés comme positifs. Ce résultat est considéré comme positif selon **THOMPSON et al.** (1996).

Par la méthode des disques imprégnés de SCN, les diamètres des (Zi) varient de 12 à 29 mm avec un diamètre moyen égal à 20,05 mm (au niveau de 10 disques).

La présente étude a montré que la méthode des spots était moins adaptée. Nous pensons qu'une mauvaise répartition du SCN ou une diffusion de bactériocine insuffisante en sont responsables.

La méthode de la dilution critique du SCN a permis de calculer l'activité antibactérienne en unité arbitraire (UA) selon l'équation de **CHAMPAGNE** (2007) :

$$A \text{ (UA / ml)} = (1000 / 10 \text{ } \mu\text{l}) \times (1/D).$$

Sachant que la dilution maximale permettant de donner encore une zone d'inhibition d'un diamètre supérieur à 2 mm par la méthode des spots, est la dilution 1/32 :

$$A \text{ (UA/ml)} = 1000/10 \times 1/ 1/32$$

$A = 3200 \text{ UA / ml}$

L'activité antibactérienne estimée par la méthode de la dilution critique de **MAYR-HARTING et al.** (1972), est donc égale à 3200 UA/ml. Mais cette mesure peut être plus ou moins acceptée. **MEGHROUS et al.** (1999) ont publié que l'estimation de l'activité d'une bactériocine par la méthode de diffusion dans l'agar est une mesure relative, car la sensibilité de la bactérie cible, le milieu de croissance utilisé, la concentration d'agar du milieu test, ainsi que la concentration en bactériocine sont tous des facteurs pouvant affecter les résultats.

L'antagonisme de la souche *Lactococcus lactis ssp.lactis* contre des souches pathogènes à GRAM négatif a été décrites dans la littérature (**CHOI et al.**, 2000 ; **TOPISIROVIC et al.**, 2006 ; **KUMARI et GARG**, 2007 ; **EL-SHAFIE et al.**, 2008). Les souches indicatrices étudiées par ces auteurs examinées appartiennent aux deux espèces : *Escherichia coli* et *Salmonella sp.*

En règle générale, les bactériocines des bactéries lactiques ne sont pas actives contre les bactéries à GRAM négatif. Ceci est du à la différence dans la composition de l'enveloppe

cellulaire des bactéries GRAM positives et GRAM négatives. Toutefois, certaines études ont suggéré qu'un changement des propriétés de perméabilité de la membrane externe suite à certains traitements utilisés en combinaison avec des bactériocines ou encore des conditions de stress rendraient les bactéries GRAM négatives sensibles aux bactériocines (**ABEE et al.**, 1995; **CINTAS et al.**, 2001; **DEEGAN et al.**, 2006).

SEBTI et al. (2002) et **CARNEIRO et al.** (1998) ont montré que pour améliorer l'activité antibactérienne contre les bactéries GRAM - insensibles aux bactériocines de bactéries lactiques, les bactériocines ont été associées à d'autres composés pour améliorer les durées de conservation des aliments. Par exemple, l'effet, dans un premier temps du lysozyme, suivi de l'action de la nisine, montre que les bactéries GRAM - sont lysées par la nisine. En effet, le nombre de *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas fluorescens* ou encore *Salmonella enterica* est diminué de l'ordre de 6 log sous l'action de la nisine dès que le lysozyme à une concentration de 10 µg.ml⁻¹ est utilisée. Ces données bibliographiques sont importantes, si l'on prend en considération l'une des principales caractéristiques du lait camelin qui est sa richesse en lysozyme par rapport au lait de référence (trois fois plus). Ceci pourrait expliquer l'importante activité antibactérienne de la souche *Lactococcus lactis ssp.lactis* vis-à-vis *Ps. Fluorescens*, mise en évidence lors de la présente étude.

Par ailleurs, la nisine et l'acide lactique agissent synergiquement sur *Ps. fluorescens* et *Staph. Hominis* isolées à partir des poissons (**NYKANEN et al.**, 1998 ; **STEVENS et al.**, 1991). Ces auteurs rapportent que la nisine inhibe la croissance des bactéries GRAM – quand elles sont traitées simultanément avec l'agent chélateur EDTA.

A notre connaissance, aucune étude sur l'effet de la nisine utilisée seule sur les *Pseudomonas* n'a été signalée dans la littérature. Cependant, le spectre d'activité des quelques bactériocines (comme la nisine) selon **KLAENHAMMER** en 1993, peut ne pas être restreint aux espèces proches taxonomiquement ou même occupant la même niche écologique que la bactérie productrice. D'un point de vue pratique, le champ d'activité d'une bactériocine peut être plus ou moins large suivant les conditions du milieu et la concentration en substance active.

Les résultats de cette étude sont encourageants dans la mesure où ils révèlent la possibilité d'utiliser les ferments lactiques d'origine cameline, producteurs de nisine pour la préservation du lait camelin réfrigéré contre les bactéries psychrotrophes, responsables de défauts fromagers. En effet, la nisine est un métabolite primaire et sa biosynthèse est fonction de la croissance bactérienne (**PIARD et DESMAZEAUD**, 1992 ; **RAY**, 1992).

Dans la pratique les applications de la nisine en industrie agroalimentaire sont limitées. En France, à titre d'exemple, la nisine n'est autorisée que dans le cas des fromages fondus (**CORRIEU et al.**, 2008). La NisaplineTM est le seul exemple d'ingrédient concentré non purifié qui est actuellement utilisé en tant qu'additif alimentaire. La NisaplineTM provient de la fermentation du lait écrémé avec la souche productrice de nisine, *Lactococcus lactis* et elle est utilisée de manière efficace dans plusieurs applications alimentaires. Cependant, elle apparaît inefficace dans certaines applications (**BENECH et al.**, 2002).

L'utilisation des ferments producteurs de nisine a également été étudiée par **TOPISIROVIC et al.** (2006) et **MORISSET et al.** (2005) dans le domaine des produits carnés. Leur utilisation dans les produits laitiers se limite à la fromagerie. La propriété de produire la nisine a d'abord été envisagée pour l'inhibition de *Clostridium botulinum* et *Clostridium tyrobuturicum* dans les fromages (**LIPINSKA**, 1957 ; **TAYLORS**, 1977).

Plusieurs raisons peuvent permettre l'utilisation de la nisine comme additif alimentaire selon **CORRIEU et al.** (2008). Tout d'abord, cette bactériocine est produite par un organisme normalement utilisé dans les fermentations alimentaires. Elle ne présente pas de toxicité. De plus, la nisine résiduelle dans les aliments est digérée, elle est en effet sensible à l' α -chymotrypsine. D'autre part, les études restent rares sur les possibilités d'acquisition de la résistance à la nisine par certains microorganismes, selon **CARLSON** et **BAUER** (1957), aucune acquisition de résistance à la nisine n'a pu être mise en évidence chez les microorganismes dans les aliments contenant un fort taux de nisine. La résistance à la nisine a été mise en évidence chez certaines types de bactéries telles que *Streptococcus thermophilus* et *Staphylococcus aureus* et *Bacillus* spp. Cette résistance est liée à la production d'une enzyme, la nisinase qui est une didéhydroalanine réductase et qui désactive la nisine et la subtiline (**HARRIS et al.**, 1991). La résistance à la nisine a été aussi liée à la rigidité des membranes bactériennes et à leur faible taux de lipides chargés négativement (**CRANDELL** et **MONTVILLE**, 1998).

Les inconvénients liés à l'emploi des bactériocines tiennent à leur spectre d'action réduit aux bactéries à Gram positif et en particulier la flore lactique. Ce spectre dépend du pH, de la température, de la composition et la structure de l'aliment. De plus, vu la nature protéique de la nisine, son activité peut être également réduite par des enzymes protéolytiques ou par oxydation, lors d'interaction avec des métaux lourds, lors d'agitation excessive et après une décongélation (**DAESCHEL et al.**, 1991).

La connaissance de l'organisation génétique, de la régulation et des relations structure-fonction des bactériocines pourra permettre de pallier ces problèmes par la mise en place de procédés antibactériens plus efficaces. Finalement, la connaissance du mode d'action des bactériocines est essentielle afin d'optimiser l'effet antagoniste de ces dernières et de limiter l'apparition de souches résistantes (**RICHARD**, 1996).

conclusion

CONCLUSION

Le lait de chamelle constitue la principale source alimentaire pour les éleveurs de dromadaires au Sahara. Il ne semble pas différent de celui des autres animaux domestiques et constitue un très bon apport en nutriments de base (protéines, lipides, glucides et vitamines), et en minéraux pour le chamelon et le consommateur. Le lait de chamelle a plusieurs vertus thérapeutiques. Il est généralement consommé à l'état cru, fermenté, pasteurisé ou stérilisé. Il peut être aussi transformé en fromage malgré des difficultés inhérentes à sa coagulation.

La pratique courante de stocker le lait à basse température est à l'origine du développement des germes psychrotrophes. Germes doués des activités protéolytiques et lipolytiques responsables par la suite de l'amertume des produits laitiers et plus particulièrement du fromage. D'autre part, la production de substances antibactériennes telles que les bactériocines par les bactéries lactiques du lait représente une voie intéressante pour la lutte contre les micro-organismes pathogènes et/ou indésirables.

Nous avons tenté à travers cette étude de contribuer d'une part à améliorer la conservabilité du lait de chamelle généralement consommé à l'état frais et d'autre part à maîtriser la technique de sa transformation en un fromage, conforme aux exigences du consommateur, par la diminution de sa flore psychrotrophe, responsable des défauts d'amertume et de mauvais goûts. Cette flore est essentiellement représentée par l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. L'inhibition de croissance de *Pseudomonas fluorescens*, isolée à partir d'un lait de chamelle entreposé à 4°C durant plus de 3 jours, est mise en évidence in vitro par l'effet d'une bactériocine (nisine) issue d'une culture de la souche lactique productrice *Lactococcus lactis ssp.lactis*. Dans le présent travail, la souche nisinogène est isolée à partir du fromage frais à base de lait chamelle préparé au niveau du laboratoire. Malgré les difficultés de coagulation du lait de chamelle, évoquées par de nombreux auteurs, le fromage que nous avons obtenu se caractérise par un rendement non négligeable (35,5%) et par des caractéristiques organoleptiques et rhéologiques acceptables. Nous avons utilisés à la place de la présure commerciale, des extraits coagulants gastriques de dromadaires âgés (ECD), conformément à des travaux entrepris à l'université de Ouargla, à raison de 10 ml / 500 ml de lait.

L'identification, des souches isolées, a été réalisée sur la base de caractérisations morphologiques et de tests biochimiques et physiologiques. L'étude de l'effet antagoniste de

surageant de la culture de *Lactococcus lactis ssp.lactis* vis-à-vis de *Pseudomonas fluorescens* a montré une inhibition de la croissance de la souche cible par l'effet bactéricide de la nisine. Pour la recherche de l'inhibition bactérienne, nous avons adopté la technique de TAG *et al.* (1971). Trois méthodes de diffusion sur gel sont utilisées et les résultats obtenus sont très probants. La mesure de diamètres des zones d'inhibition sur la culture de la souche cible a révélée une variation des résultats pour chaque méthode. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 9 à 18 mm pour la technique des puits et de 12 à 29 mm pour la méthode des disques. La technique des spots a donné des zones d'inhibition peu apparentes. On peut constater alors que la netteté des zones d'inhibition dépend de la méthode utilisée. La méthode des disques semble la plus intéressante.

Enfin, l'isolement des bactéries lactiques particulièrement à partir du fromage ou du lait de chamelle et la mise en évidence de leur pouvoir antagoniste par la production des bactériocines, contre la flore à GRAM négatif, constitue un sujet intéressant à approfondir dans la mesure où peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur ces microorganismes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

ABEE T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism producer organism. *FEMS Microbiol. Letters*, **129**, 1-10.

ABU-TARABOUSH H. M., AL-DAGAL M. M., AL-ROYLI M. A. (1998). Growth, viability, and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *Journal of Dairy Science*, **81**, 354-361.

ADAMS D.M., BARACH J.T., SPECK M.L. (1975). Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, **58**, 828-834.

ADAMS D.M., BARACH J.T., SPECK M.L. (1976) Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, **59**, 823-827.

AGRAWAL RP, KOCHAR DK, SAHANI MS, TUTEJA FC, GHOURI S K. (2004). Hypoglycemic activity of camel milk in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Diab. Dev. Countries*, **24**, 47-9.

ALICHANIDIS E., ANDREWS A.T. (1977). Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR-II. *Biochimica Biophysica Acta.*, **485**, 424-430.

ALLOUCHE F.N., HELLAL A., LARABA A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue « Nature et Technologie »*. N° **03**, 13 -20.

ANASTASIADOU S., PAPAGIANNI M., AMBROSIADIS I., KOIDIS P. (2008). Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production .152 *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13(1)**, 143-154.

ANONYME (1965). Le chameau en Algérie. Situe de technologie agricole. Mostaganem, 1-52.

AUDISIO M.C., OLIVERA G., APELLA, M.C. (2001). Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 235-241.

B

BADAoui Dj. (2000). Contribution à la connaissance du lait de chamelle : Essai de caractérisation des protéines par Electrophorèse sur Gel de Poly-Acrylamide (PAGE). Thèse d'Ingéniorat. Institut d'Agronomie Saharienne. Université d'Ouargla.

BAREFOOT S. F., KLAENHAMMER T. R. (1983). Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., **45**, 1808–1815.

BEG O.U, VON BAHR-LIND STROM H., ZAIDI Z.H., TORNVALL H. (1986). A camel milk protein rich in half cystine, primary structure assessment of variations, internal repeat patterns and relationship with neurophysin and other active polypeptides. Eur. J.Biochem, Aug., **15(1)**, 195-201.

BENECH R.O, KHEADR E.E, LARIDI R., LACROIX C., FLISS I. (2002a). Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. Appl. Environ Microbiologie, **68**, 3683-3690.

BENGANA M. (2001). Caractérisation des enzymes protéolytiques (pepsine, chymosine) isolées à partir des caillettes de bovins adultes. Thèse de Magister Institut national d'Agronomie. El – Harrach. Alger, 1-82.

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

BENGTSOON K.L., GARDHAGE L., ISAKSOONB. (1973). Gelation in URT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistant proteases. Milchwissenschaft, **28**, 495-499

BENKERROUM N. (2008). Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. African Journal of Biotechnology, **7**, 4856-4867.

BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE C. L., MOULTI-MATI F., SI AHMED S., MAHBOUB N., SIBOUKEUR O. AND MATI A. (2011). Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. Emir. J. Food Agric., **23 (4)**, 301-310.

BOUKSAIM M., FLISS I., MEGHROUS J., LACROIX C., SIMARD RE. (1998). Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. J. Appl. Microbiol., **84**, 176-184.

BOUKSAIM M., LACROIX C., BAZIN R., SIMARD R.E. (1999). Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immuno-location of nisin in producing and sensitive bacteria strains. J. Appl –Microbiol. **87**: 500-510.

BOURGEOIS C.M., LARPENT J.-P. (1996). Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. 2e Ed. Tec & Doc.

BREUKINK E., VAN KRAAIJ C., VAN DALEN A., DEMEL RA., SIEZEN RJ., DE KRUIJFF B., KUIPERS OP. (1998). The orientation of nisin in membranes. Biochemistry, **36**, 8153-8162.

C

CALLEWAERT R., HUGAS M., VUYST L. D. (2000). Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **57**, 33-42.

CARNEIRO A. M. S., CASSAR C. A., MILES R. J. (1998). Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *Journal of Food Protection*, **61**(7), 839-844.

CENATIEMPO Y., BERJEAUD J.M., BIET F., FREMAUX C., HECHARD Y., ROBICHON D. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le lait*, **76**, 169-177.

CHAIBOU M. (2005). Productivité zootechnique du désert : le cas du bassin laitier d'AGADEZ au NIGER. Thèse de Doctorat de l'université de MONTPELLIER II, France.

CHAMBA J.-F., MICHEL V., HAUWUY A. (2001). La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait*, **81**, 575-592.

CHAMPAGNE A. (2007). Potentiel antagoniste des bactéries lactiques épiphytes de plantes fourragères contre le développement des clostridies dans l'ensilage. Pour l'obtention du grade de maître es sciences (M.Sc.) de l'université LAVAL au QUÉBEC, Canada.

CHEN Q., HU J., YUN X. X. (2006). Screening, isolation and identification of nisin Resistance determinant gene in strains of *Lactococcus lactis*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **26**, 839-842.

CHILLIARD Y. (1989). Particularités du métabolisme des lipides et du métabolisme énergétiques chez le dromadaire. *Options méditerranéennes. Série Séminaire n°2*, 101-110.

CHOI H.J., CHEIGH C.I., KIM S.B., PYUN Y.R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis subsp. lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 563– 571.

CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J.C., LAMBERET G., LENOIR J., TOURNEUR C. (1984). Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage ; in : « Le Fromage ». Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES I.F., CHIKINDAS M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1-20.

CORRIEU et al. (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. éd. Lavoisier. Paris. France.

COUSIN M.A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot.*, **45**, 172-207.

D

DAESCHEL MA., JUNG D-S. and WATSON BT. (1991). Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin resistance strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 601 -603.

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* UL 719 .mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.) à l'université Laval, Canada.

DE ROISSART et LUQUET (1994). Properties of nisin Z and distribution of its gene Nis Z in *Lactococcus lactis* *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 213-218.

DE VUYST L., VANDAMME E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Ed. De Vuyst. L. and E. J. Vandamme. London: Blackie Academic & Professional, 91-128.

DEETH H.C, KHUSNIATI T., DATTA N., WALLACE R.B. (2002) .Spoilage patterns of skim and whole milks. *J. Dairy Res.*, **69**, 227-241.

DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M. C., JANSSENS D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans *Bactéries lactiques* volume 1. LORICA : Uriage, 25- 116.

DILANYAN S.H. (1959). Utilization of mares, ewes, camels and yaks milk in the USSR. Report Int. Comm. Dairying in warm countries. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

DIOP M. B. (2008). Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes à améliorer la technique de conservation des poissons par salaison au Sénégal .mémoire en vue de l'obtention du grade de Doctorat de l'universitaire de Gembloux, Belgique.

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

DOUMANDJI A., HELLAL A., SAIDI N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, **4(2)**, 25-47.

DOYLE MP., BEUCHAT LR., MONTVILLE TJ. (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: ASM Press, 94.

DRIESSEN AJM., VAN DEN HOOVEN HW., KUIPER W., VAN DE KAMP M., SAHL HG., KONINGS RNH., KONINGS WN. (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **34**, 1606-1614.

E

EDIMA C. (2007). *Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et potentialités en industries fromagères. Thèse de doctorat à L'INPL à l'université de Nancy, France.

EL-AGAMY E., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE CP., ASSAF R. (1992). Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J. Dairy Res.*, **59**, 169-175.

EL-AGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P., ASSAF R. (1996). Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, **6**, 129-145.

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

EL-BATAWY M.A., AMER S.N. et IBRAHIM S.A. (1987). Camel Abomasums as a source of rennet substitute. *Egyptian J. Dairy Sci.*, **15**, 93-100.

EL-HADI SULIEMAN A., ILAYAN A. A., EL FAKI A. E. (2006). Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 321-328.

EL-SHAFIE H.A., IBRAHIM N., ABD EL-SABOUR H., MOSTAFA Y.A. (2008). Purification and characterization of bacteriocin produced by isolated strain of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Sciences Research*, **4(11)**, 1315-1321.

F

FAIRBAIM D.J. and LAW B.A. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.*, **53**, 139-177.

FARAG S. I. and KABARY K. M. (1992). Chemical composition and physical properties of Camel's milk and milk fat. In *Proceedings of the 5th Egyptian conference on dairy science and technology*. Cairo, Egypt: Egyptian Society of Dairy Sciences.

FARAH Z., RÜEGG M. W. (1989). The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, **8**, 211-216.

FARAH Z. (1993). Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy Res.*, **60**, 603-623.

FARAH Z., STREIFF T., BACHMANN M R. (1990). Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *J. Dairy Res.*, **57**, 281-283.

FARAH Z. (1996). Camel milk properties and products. St. Gallen, Switzerland: SKAT, Swiss Centre for Developments Cooperation in Technology and Management.

FARAH Z. & ATKINS D. (1992). Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, **59**, 229-231.

FAYE B. (1997). Guide de l'élevage du dromadaire, éd. Sanofi, Libourne, France.

G

GORBAN A. M. S. & IZZELDIN O. M. (1999). Study on cholesterol ester fatty acids in camel and cow milk lipid. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 229-234.

GOURSAUD J. (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. In : LUQUET, F.M. - Laits et produits laitiers. 1ère éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier, **1(1)**, 1-90.

GRIFFITHS M.W. and PHILLIPS J.D. (1990a). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus spp.* found in raw and pasteurized milk. *Int. J. Dairy. Technol.*, **43**, 62-66.

GUERRA N. P., TORRADO A., LOPEZ C., PASTRANA L. (2005). Modeling the fed-batch production of pediocin using mussel processing wastes. *Process. Biochemistry*, **40**, 1071–1083.

[GUILLAUME.](#) (2004). La microbiologie : les milieux de culture. Référence électronique.

[GUILLAUME.](#) (2004). La microbiologie : les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques. Référence électronique.

GUIRAUD J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. P.

H

HARLANDER S. K. (1993). Regulatory aspect of bacteriocin use. In bacteriocins of lactic acid bacteria. Ed. D.G Hoover & L.R. Steenson, Academic Press, London. England, 233-248.

HASPER H.E., DE KRUIJFF B., BREUKINK E. (2004). Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*, **43**, 11567-11575.

HENG N. C et TAGG J. R. (2006). what's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiol.*, **4**, 1-2.

HECHARD Y. et SAHL H.G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, **84**, 5-6, 545-57.

HIRSCH A. & GRINSTED E. (1951). The differentiation of the lactic streptococci and their antibodies. *Journal of Dairy Research*, **18**, 198-204.

HURST A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, **27**, 85–123.

I

IZQUIERDO A.E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat de l'université de Strasbourg, France.

J

JACK R. W., TAGG J. R ET RAY B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiol Rev., **59**, 17 1-20.

JARDALI Z. (1988). Contribution à l'étude de la composition du lait de dromadaire. Mémoire de DEA présenté à l'ENSAIA, Nancy, France.

JOFFIN J.N. ET JOFFIN C. (1992). Microbiologie alimentaire, 4e éd., Centre régional de Documentation pédagogique de Bordeaux, France.

JOFFIN J.N. et LEYRAL G. (2001). Microbiologie. Dictionnaire des Techniques, 3ème Ed., Collection Biologie Technique. CRDP d'aquitaine, Bordeaux.

K

KALCHAYANAND N., HANLIN M.B. AND RAY B. (2008). Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin ACH and nisin. Letters in Applied Microbiology, **15**, 239 – 243.

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

KAMOUN M. (1994). Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : Conséquences technologiques. In Bonnet P., éd. (1998). Dromadaires et chameaux, animaux laitiers. Actes du colloque, 24-26 Octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie. Montpellier, France : CIRAD.

KAPPELER S., FARAH Z. & PUHAN Z. (1999). Alternative splicing of lactophorin mRNA from lactating mammary gland of the camel (*Camelus dromedarius*). Journal of Dairy Science, **82**, 2084-2093.

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

KHASKHELI M., ARAIN M.A., CHAUDHRY S., SOOMROA. H. et QURESHI T.A. (2005). Physico-chemical quality of camel milk. Journal of Agriculture and Social Sciences **2**, 164-166.

KHERASKOV S. G. (1953). Camel's milk and its products. Konevodstro, **23**, 35-37.

KIHAL M., CHEKROUN A., BENSOLTANE A., KHEROUA O. and SAIDI D. (1999). Characterization of Algeria raw camel's milk: proteins content and native lactic acid bacteria, 1ères Journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla.

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

KLEEREBEZEM M., QUADRI L.E. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, **22**, 1579-1596.

KONUSPAYEVA G., FAYE B., LOISEAU G. & LEVIEUX D. (2007). Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*, **90**, 38-46.

KORKEALA H., ALANKO T., MÄKELÄ P. and LINDROTH S. (1989). Shelf-life of vacuum-Packed cooked ring sausage at different chill temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, **9**, 237-247.

KOUNIBA A. M., BERRADA et EL MARAKCHI A. (2007). Étude comparative de la composition chimique du lait de chèvre de la race locale Marocaine et la race alpine et évaluation de leur aptitude fromagère. *Revue Méd. Vét.*, **158(03)**, 152-160.

KUMARI A.A. et GARG A.P. (2007). A bacteriocin from *Lactococcus lactis* CCSUB94 from milk and milk product. *Research Journal of Microbiology*, **2(4)**, 375-380.

L

LACHANCE M. (2000). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MJC15. Département des sciences des aliments et de nutrition. Université Laval, Qc., Canada.

LALEYE L. C., JOBE B. et WASESA A. A. H. (2008). Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine whey proteins. *Journal of Dairy Science*, **91**, 4527-4534.

LARPENT S. P. (1997). Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Ed. Tech et Doc, Lavoisier, Paris.

LE JAOUEN J.C. (1993) .Guide national des bonnes pratiques en production fromagère fermière. 1ère éd. Paris : Institut de l'élevage, **3**, 123-144.

LEAL-SANCHEZ M.V, JIMENEZ-DIAZ R., MALDONADO-BARRAGAN A., GARRIDO-FERNANDEZ A., RUIZ-BARBA J.L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lb. plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4465-4471.

LENOIR J., LAMBERET G. et SCHMIDT J. L. (1983). L'élaboration d'un fromage: l'exemple du Camembert. *Pour la science*, 30-42.

LERICHE V. D., CHASAING B. , CARPENTIER B. (1999). Behavior of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, **51**, 169-182.

LEROY F. et al. (2006). Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 102-111.

LV. W., ZHANG X. ET CONG W. (2005). Modeling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 322-326.

M

- MAHBOUB N., TELLI A., SIBOUKEUR O., BOUDJENAH S., SLIMANI N. et MATI A.** (2010). contribution à l'amélioration de l'aptitude fromagère du lait camelin : étude des conditions de conservation des enzymes gastriques camelines. *Annales des Sciences et Technologie* Vol. 2, N° 1.
- MANTOVANI H. C. ET RUSSELL J. B.** (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. *Int. J. Food Microbiol.*, **89**, 77-83.
- MAYERHOFER H. J., MARSHALL R. T., WHITE C. H. and Lv. M.** (1973). Characterization of a heat stable protease of *Pseudomonas fluorescens* 26. *Applied Microbiology*, **25**, 44-48.
- MCCLINTOCK M., SERRES L., MARZOLF L.J., HIRSCH A., MOCQUOT G.** (1952). Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de gruyère fondu, *J. Dairy Res.*, **19**, 187-193.
- MEGHROUS J., GOULHEN F., LACROIX C.** (1999). Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeates. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 399-406.
- MEHAIA M. A., HABLAS M. A., ABDEL-RAHMAN K. M., & EL-MOUGY S. A.** (1995). Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, **52**, 115-122.
- MERIN U., BERNSTEIN S., BLOCH-DAMTI A., YAGIL R., VAN CREVELD C., LINDNER P.** (2001). A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrums. *Livestock Production Science*, **67**, 297-301.
- MÉTIVIER A., BHUGALOO-VIAL P., DOUSSET X., SOROKIN O., ANGLADE P., BOYAVAL P. and MARION D.** (1996). Purification and amino acid sequences of piscicocins VIa and VIb, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4410-4416.
- MIKOLAJCIK E.M.** (1979). Psychrotrophic bacteria and dairy product quality. 1. Major organisms involved and defects produced. *Cult. Dairy Prod.*, **14**, 6-10.
- MILLIERE J. B. et VEILLET-PONCET L.** (1979). Détermination de la flore bactérienne caséolytique psychrotrophe des laits crus réfrigérés. *Le lait / janvier-février 1979* /, 581-582
- MIRANDA G. et GRIPON J.C.** (1986). Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait*, **66**, 1-8.

MOHAMED M.A. and LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. (1994). Camel's (Camelus Dromedarius) Milk: properties important for processing procedures and nutritional value. Actes du Colloque : « Dromadaires et chameaux animaux laitiers », 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

MOLL G. N., KONINGS W. N. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 185- 198.

MONTVILLE T.J., BRUNO MEC. (1994). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 53-74.

MORISSET D., BERJEAUD J.M., FRERE J., HECHARD Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques et probiotique*. Ed. Agroalimentaire CST. Lavoisier, **307**, 113 - 209.

MOTA-MEIRA M., LAPOINTE G., LACROIX C., LAVOIE MC. (2000). MICs of mutacin B-Ny266, Nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents Chemother.*, **44**, 24-29.

MUGOCHI T., NANDAKUMAR M.P., ZVAUYA, R. et MATTIASSON B. (2001) .Bioassay for the rapid detection of bacteriocins in fermentation broth. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1243-1247.

MULDERS JWM., BOERRIGTER IJ., ROLLEMA HS., SIEZEN RJ., DE VOS WM. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 581-584.

N

NES I. F., DIEP D. B., HAVARSTEIN L. S., BRURBERG M. B., EIJSINK V. et HOLO H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **70**, 2-4, 113-28.

NES I. F. et HOLO H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers.*, **55**, 1, 50-61.

NIELSEN S.S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. *J.Agric. Food Chem.*, **50**, 6628-6634.

NYKÄNEN A., LAPVETÄINEN A., HIETANEN R.M. et KALLIO H. (1998). Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **31**, 361-365.

O

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

OUALI S. (2003). Qualité du fromage a pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie de Draa Ben Khedda : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigéré du fromage .Mémoire De Magister en Sciences Alimentaires. Université Frères Mentouri. Constantine. Algérie.

P

PAPAGIANNI M., AVRAMIDIS N., FILIOUSSIS G., DASIOU D. et AMBROSIADIS I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: Assessing the factor "indicator microorganism". *Microb. Cell Fact.*, **5**, 30-44

PAQUET D., DRIOU A., BRACQUART P. and LINDEN G. (1987). Effect of refrigerated storage of milk on proteolysis. Relationship to the proteose-peptone content. *Neth. Milk Dairy J.*, **41**, 81-92.

PARENTE E., BRIENZA C., MOLES. M. et RICCIARDI A. (1995) .A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Meth.*, **22**, 95-108

PARENTE E., ANNUNZIAIA M., RICCIORD A. et CLEMENTI FE. (1999). The combined effect of nisin, leucocin F1O, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *International Journal of Food Microbiology.*, **40**, 65-75.

PETERSEN F.C., FIMLAND G. ET SCHEIE A. A. (2006). Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.*, **61**, 1322-1334.

PIARD JC. , DESMAZEAUD M. (1992). Inhibitions' factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, **72**, 113-142.

PLOEG J.R. et VAN DER (2005). Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing System required for development of genetic competence. *J. Bacterial.*, **187**, 3980-3989.

PONGTHARANGKUL T. et DEMIRCI A. (2006). Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, **22**, 217-224.

R

RAMET J.P. (1994). Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication des fromages au lait de dromadaire. Actes du colloque, 24-26 Octobre, Nouakchott, Mauritanie.

RAMET J.P. (1987 b). Production de fromages à partir de lait de chamelle en Tunisie. Rapport F.A.O. Rome (I).

RAMET J. P. (1989). Use of bovine calf rennet to coagulation raw camel milk. *World Animal Review*, **61**, 11-17.

RASOLOFO E.A. (2010). Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Mémoire pour l'obtention du grade de Philosophie doctor (Ph.D.) de l'université Laval .QUÉBEC .CANADA.

RAUCH PJG., BEERTHUYZEN MM., DE VOS WM. (1994). Distribution and evolution of nisin sucrose elements in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1798-1804.

RAY B. (1992). Bacteriocins of starter culture bacteria as food bio-preservatives: an Overview. In Food Preservatives of Microbial Origin, ed. B. Ray & M.A. Daeschel. CRC Press. Boca Raron. FL. 177-206.

RAYMAN MK., ARIS B., HURST A. (1981). Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. App/ Environ Microbio., **41**,375-438.

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.

REISINGER P., SEIDEL H., TSCHESCHE H., HAMMES WP. (1980). The effect of nisin on murein synthesis. Arch. Microbiol., **127**, 187-193.

REUNANEN J., HAKOVIRTA J. ET SARIS P. E. J. (2006). Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products. Appl. Environ. Microbiol., **72**, 1001-1005.

RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER T.B., GROSCLAUDE F. (1971). Structure primaire de la caséine α 1(B) bovine ; séquence complète. European Journal of Biochemistry, **23**, 41-51.

RICHARDSON B.C., NEWSTEAD D.F. (1979). Effect of heat-stable proteases on the storage life of UHT milk. N.Z. J. Dairy Sci. Technol., **14**, 273-279.

ROLLEMA HS., KUIPERS OP., BOTH P., DE VOS WM., SIEZEN RJ. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 2873-2878.

ROWE M.T., GILMOURA (1982). Growth, enzyme production and changes in oxygen tension occurring during batch cultivation of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains. Milchwissenschaft, **37**, 597-643.

RUHR E., SAHL HG., (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. Antimicrob. Agents Chemother., **27**, 841-845.

S

SAHL HG., BIERBAUM G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of Uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol., **52**, 41-79.

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

SANDINE WE., RADICH PC., ELLIKER PR. (1972). Ecology of the lactic streptococci. J. Milk Food Technol., **35**, 176-184.

SAVIJOKI K., INGMER H. and VARMANEN P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., **71** (4), 394-406.

SAWAYA W. N., KHALIL J. K., AL-SHALHAT A., AL-MOHAMMAD H. (1984). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. Journal of Food Science, **49**, 744-747.

SBOUTI A., KHORCHANI T., DJEGHAM M. et BELHADJ O. (2009). Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures ; Afrique SCIENCE **05**(2), 293 – 304.

SCANNELL A. G. M., HILL C., ROSS R. P., MARX S., HARTMEIER W. and ARENDT E. K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and Nisaplin. International Journal of Food Microbiology, **60**, 241-249.

SEBTI I. (2002). Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse de doctorat .France.

SHALASH M. R. (1979). Utilization of camel meat and milk in human nourishment. Provisional Report No. 6 Workshop on camels, Khartoum, Sudan. Stockholm, Sweden: International Foundation of Science. 285-306.

SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005). Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (*Camelus dromedarius*): Utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. Cahier Agriculture, **14**(5), 473-478.

SIBOUKEUR O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Mémoire de Doctorat de l'institut national agronomique El-Harrach-Alger. Algérie.

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

STEVENS KA., SHELDON BW., KLAPES NA., KLAENHAMMER TR. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 3613-3615.

T

TADESSE G., EPHRAIM E. et ASHENAFI M. (2004). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. Food Safety, **5**, 13-20.

TAGG JR., DAJANI AS., WANNAMAKER LW. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol Rev., **40**, 722-756.

TAGG J. R. and MCGIVEN A. R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, **21**, 943-948.

TAYLOR LY., CENN DD., WELCH BI. (1990). Antimicrobial properties of nisin in fresh fish package in an atmosphere of carbon dioxide. *J. Food Prot.*, **53**, 953-957.

TAYLOR SL.ET SOMERS EB. (1985) .Evaluation of the antibacterial effectiveness of nisin-in bacon. *J. Food. Prot.*, **48**, 949-952.

TE WHAITII E.et FRYERT F. (1978). Production and heat stability in milk of proteinases and lipases of psychrotrophic *Pseudomonas*. XXe Int. Dairy Congr., Paris, 303-304.

TEUBER M., GEIS A., NEVE H. (1992). The genus *Lactococcus*. Dans the prokaryotes 2nd edition. Balows A., Trifper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. Eds ; Springer Verlag. : New York, 1482-1501.

THOMAS S. B. and THOMAS B. F. (1973). Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk collected raw milk. *Dairy Ind.*, **38** (1), 11-15; (2) 61-70.

THOMPSON J.K., COLLINS M.A. et MERCER W.D. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 338-348.

TODOROV SD., MEINCKEN M., DICKS LMT. (2006) .Factors affecting the adsorption of bacteriocins ST194BZ and ST23LD to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus sp.* *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **52**, 159-67.

TOPISIROVIC L., KOJIC M., FIRA D., GOLIC N., STRAHINIC I. et LOZO J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **112** (3, 1), 230-235.

TRAMER J. and FOWLERG G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **15**, 522-528.

TRAMER J. (1966) Nisin in food preservation. *Chem. Ind.*, **11**, 416-450.

TROUPEL C. (2007) .Les Bactériocines des Bactéries Lactiques. Références électronique.

TURCOTTE C., LACROIX C., KHEADR E., GRIGNON L., FLISS I. (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, **90**, 283-293.

TUNELI A. et DELVES-BROUGHTON J. (1998). International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy. Fed. Bull.*, **329**, 20-23

V

VAN DEN HOOVEN HW., SPONK CAEM., VAN DE CAMP M., KONINGS RNH., HILBERS CW., VAN DEN VEN FJM.(1996). Surface location and orientation of the lantibiotic

nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecyl phosphocholine and of sodium dodecylsulphate. Eur. J. Biochem., **235**, 394-403.

VÉZINA et LACROIX (2000). Tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium* (*erwinia* pectinolytiques) et des *Pseudomonas* fluorescents. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection – MAPAQ.

VIGNOLA C. (2002). sciences et technologies du lait : transformation du lait. éd : ISBN. Paris. France.

W

WANGO H J., FARAH Z. and PUHAM Z. (1998). Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. Milchwissenschaft, **53**(3), 136-139.

WILSON R.T. (1984). The Camel. Ed. Longman, London and New-York.

X

XIA LIU, YOON-KYUNG CHUNG, SHANG-TIAN YANG, AHMED E. YOUSEF. (2003). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. Process Biochemistry, **40**, 13–24.

Y

YAGIL R., ETZION Z. (1980). Milk yield of camels (*Camelus dromedarius*) in drought areas. Comp. Biochem. Physiol., **67** (1), 207-209.

YAGIL R. (1982). Camels and camel milk. In: Animal production and health paper n° 26. Publication FAO (Food and Agriculture Organization). Rome.

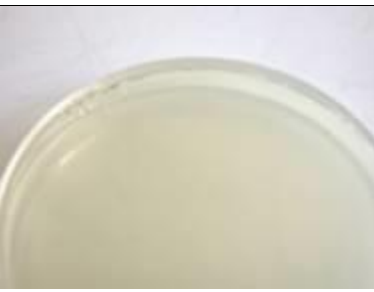
YAGIL R. (1987). Camel milk – A review. Int. J. Anim. Sci., **2**, 81-89.

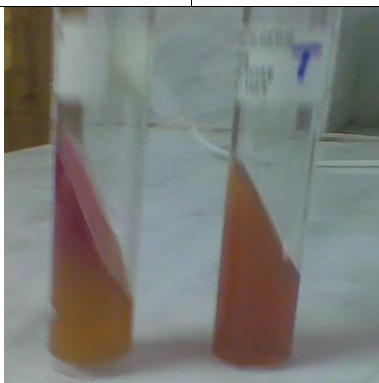
YAGIL R., SARAN A. and ETZION Z. (1984). Camel milk for drinking only. Comp. Biochem. Physiol., **78**, 263-266.

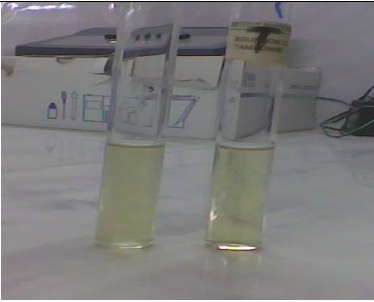
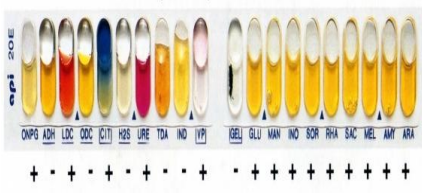
Annexes

Annexe 01

Composition des milieux des cultures et des différents bouillons utilisés :

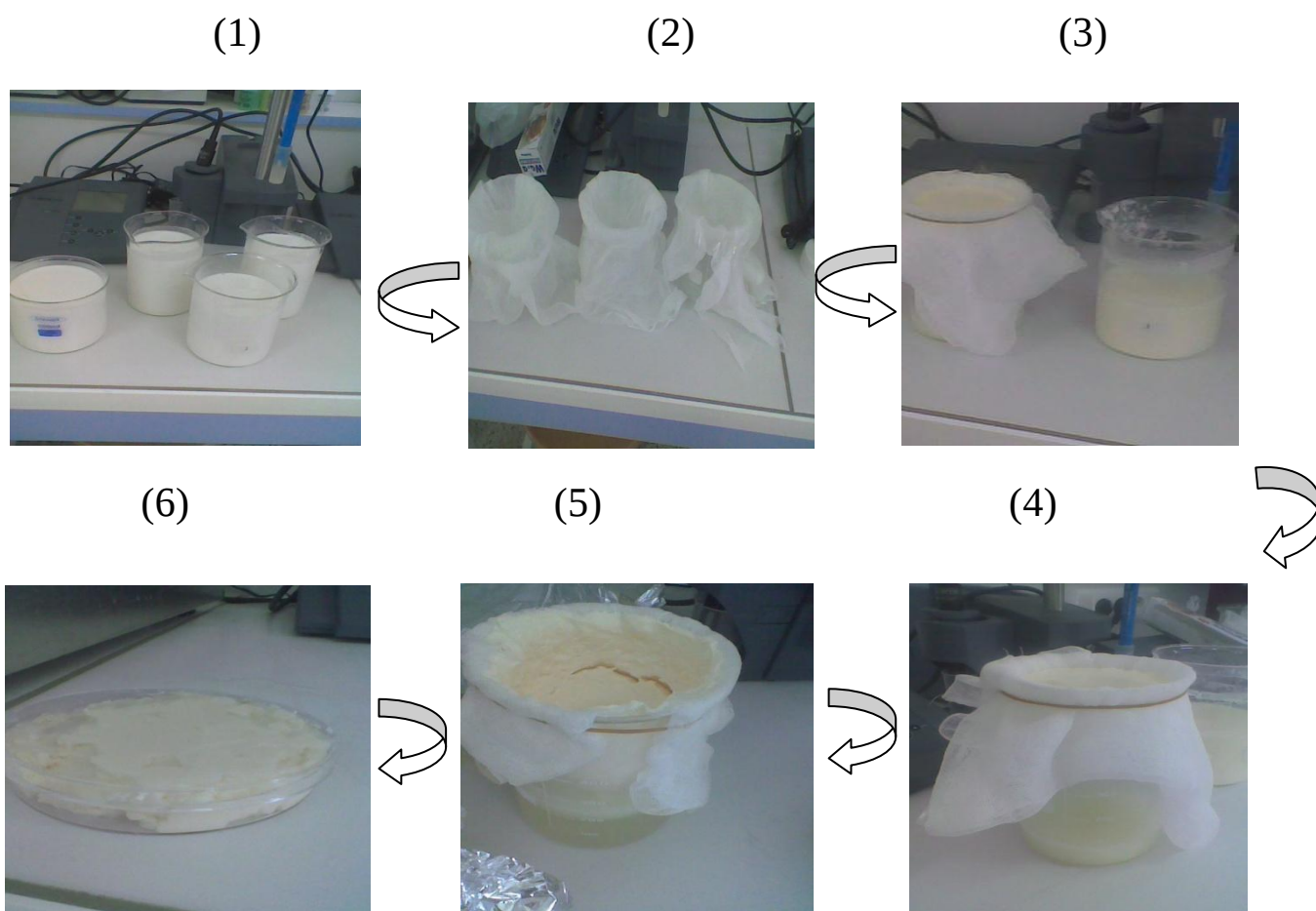
milieux de culture	Composition (g/l)	aspect de milieux avant l'ensemencement	aspect de milieux après l'ensemencement
bouillon M 17	Peptone de soja 5 Peptone de viande 2,5 Peptone de caséine 2,5 Extrait de viande 5 Extrait de levure 2,5 Lactose 5 Acide ascorbique 0,5 Glycérophosphate de sodium 19 Sulfate de magnésium 0,25 pH = 7,1 (milieu M17 gélose: il s'agit du milieu précédant + 15 g/l d'agar.)		
GNO (gélose nutritive ordinaire)	Peptone 10 Extrait De Viande 4 Chlorure De Sodium 5 Agar 13 pH = 7,2		
Mueller-Hinton	Extrait de viande 2 Hydrolysate acide de caséine 17,5 Amidon 1,5 Gélose 10 pH = 7,4		

milieu King A + milieu King B	King A	Peptone 20 Glycérol 10 ml Sulfate de potassium 10 Chlorure de magnésium 1,4 Gélose 15		
	King B	Protéose-peptone 20 Glycérol 10 ml Phosphate di potassique 1,5 Sulfate de magnésium 1,5 Gélose 15		
	pH = 7,2			
milieu T.S.I		Peptone 20 Extrait de viande 3 Extrait de levure 3 Chlorure de sodium 5 Glucose 1 Lactose 10 Saccharose 10 Citrate de fer 0,5 Hyposulfite de sodium 0,5 Rouge de phénol 25 mg Gélose 12		
	pH = 7,4			
milieu K.I.A		Peptone 20 Extrait de viande 3 Extrait de levure 3 Lactose 10 Glucose 1 Sulfate ferreux 0,3 Chlorure de sodium 5 Hyposulfite de sodium 0,3 Rouge de phénol 25mg Gélose 15		
	pH = 7,4			
bouillon de Clark et Lubs		Peptone 10 Phosphate Dipotassique 2 Glucose 5		
	pH = 7			

Bouillon Nutritif (BN)	Peptone 10 Extrait de viande 5 Chlorure de sodium 5 pH = 7,2		
milieu Mannitol de mobilité	Peptone 20 Nitrate de Potassium 1 Mannitol 2 Rouge de Phénol 40 mg Gélose 4 pH = 8,1		
galerie API 20 E	Galerie constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée permettant de réaliser 23 tests biochimiques		

Annexe 02

Etapes de fabrication du fromage camelin frais au laboratoire



(1) Echantillons du lait,

(2) Dispositif d'exsudation,

(3) (4) Egouttage du caillé,

(5) Caillé égoutté (après 24 heures d'égouttage),

(6) Fromage moulé.

Annexe 03

Coloration de Gram :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ;
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée ;
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes ;
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette;
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

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