

Université d'Oran



Faculté des Sciences
Département de Biologie
Laboratoire de Microbiologie appliquée

Mémoire de Magister

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Option : Contrôle et hygiène microbiologique

Intitulé

Caractérisation microbiologique et moléculaire des bactéries lactiques isolées du lait cru de chamelle

Présenté par NAOUI Nabila

Présenté et soutenu le 22 /04 /2013

Devant les membres du jury:

Président	Mr. AOUES ABDELKADER	Professeur à l'université d'Oran, Es-Sénia
Examineur	Mr. HENNI JAMAL EDDINE	Professeur à l'université d'Oran, Es-Sénia
Examineur	Mr. GUESSAS BETTACHE	Professeur à l'université d'Oran, Es-Sénia
Examineur	M ^{lle} . BENMECHERNENE ZINAB	MCA à l'université d'Oran, Es-Sénia
Rapporteur	Mr. KIHAL MEBROUK	Professeur à l'université d'Oran, Es-Sénia

Année 2013

Remerciements

Dans un premier temps je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon encadreur, professeur KIHAL Mabrouk pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité, sa gentillesse et ses encouragements, merci de m'avoir donné la possibilité de réaliser ma thèse dans la meilleur des ambiances.

Je remercie le Professeur AOUES ABDELKADER, de l'université d'Oran Es-Sénia, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

J'exprime toute ma gratitude aux membres de jury le professeur HENNI Jamal Eddine, le professeur GUESSAS BETTACHE, et le docteur BENMECHERNE ZINAB, merci d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Un grand merci aux Enseignants et membres du Laboratoire, les doctorant de la promotion LMD, tous les étudiants de ma promotion de Magister : Wafaa, Aicha, Fatema , Bachir et Yahya, avec qui j'ai passé de très bon moments.

Enfin un grand merci à Merzouk amina et Younes pour toute leur remarquables et généreuses aides, leur conseils et leur gentillesse.

Merci à Nawel notre technicienne de laboratoire

Je dédie ce travail à toute ma famille, pour leur patience, leur encouragement.....

A toute personne, qui a de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Remerciement

Résumé

Abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

CHAPITRE I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1	Aperçu sur le dromadaire	3
1.1	Taxonomie des camélidés.....	3
1.2	Répartition géographique des dromadaires.....	5
1.2.1	Distribution dans le monde.....	5
1.2.2	Distribution en Afrique	6
1.2.3	Densité des dromadaires.....	6
	• <i>Densité très faible</i>	6
	• <i>Densité faible</i>	7
	• <i>Densité moyenne</i>	7
	• <i>Densité forte</i>	7
1.2.4.	Répartition en Algérie.....	9
	• <i>Comment le dromadaire est arrivé à notre pays?</i>	9
	• <i>La place du dromadaire en l'Algérie</i>	10
	• <i>Evolution numérique du cheptel camelin en Algérie</i>	10
	• <i>Répartition du cheptel national</i>	10
	• <i>L'élevage des chamelles laitières en Algérie</i>	11
2	La production laitière cameline.....	13
2.1	Caractéristiques du lait de chamelle.....	16
2.2	Qualité microbiologique du lait camelin.....	16
3	Les bactéries lactiques.....	16
3.1	Introduction.....	16
3.2	Habitat.....	17
3.3	Utilisation industrielle des bactéries lactiques.....	17
4.2	Identification des bactéries lactiques.....	19
4.2.1	Notion d'espèce bactérienne	19
4.2.2	Identification microbienne	21
4.2.3	Méthodes phénotypiques	22
4.2.4	Méthodes physico-chimiques	22

•	<i>Profils protéiques</i>	22
•	<i>Spectres infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)</i>	23
4.2.5	Méthodes génotypiques	23
•	<i>Hybridation ADN-ADN et stabilité thermique des hybrides</i>	24
•	<i>Séquençage de l'ADNr</i>	24
•	<i>Typage moléculaire</i>	25
•	<i>Hybridation spécifique</i>	27

CHAPITRE II- MATERIEL ET METHODE

1	Échantillonnage.....	29
2	Isolement des souches lactiques.....	29
3	Purification.....	29
4	Identification des isolats.....	29
4.1	Caractéristiques morphologiques.....	30
4.2	Type fermentaire.....	30
4.3	Résistance à la salinité.....	30
4.4	Croissance à pH basique.....	30
4.5	Croissance à différentes températures.....	30
4.6	Hydrolyse de l'arginine.....	30
4.7	Production de dextrane.....	32
4.8	La production d'acétoïne.....	31
4.9	Utilisation du citrate.....	31
4.10	Fermentation des sucres.....	31
5	Caractérisation des aptitudes technologiques.....	32
5.1	Cinétique de croissance et d'acidification.....	32
5.2	Dosage de l'acidité.....	32
5.3	Dénombrement bactérien.....	32
5.4	Détermination des paramètres de croissance.....	33
6	Profil protéique.....	34
6.1	Extraction des protéines totales.....	34
6.2	Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	34
•	<i>Gel de séparation</i>	34
•	<i>Gel de concentration</i>	35
7	Préparation de l'appareillage de support.....	36
8	Dépôt des échantillons.....	37
9	Migration différentielles des protéines.....	37
10	Révélation des protéines.....	37
11	Analyse de l'électrophoregramme.....	37

CHAPITRE III –*RESULTT ET DISCUSSION*

1	Identification des espèces.....	39
1.2	• Caractéristiques du genre <i>Lactococcus</i> (<i>Lc</i>).....	41
1.3	• Caractérisation du genre <i>leuconostoc</i> (<i>Ln</i>).....	41
1.4	• Caractérisation du genre <i>Weissella</i>	43
2.	Identification des isolats au niveau du genre.....	43
3.	Identification au niveau de l'espèce.....	46
4.	Caractérisation moléculaire.....	48
5.	Étude cinétique.....	50
5.1.	Détermination de la courbe de croissance bactérienne.....	50
	• Cinétique de croissance des souches de <i>Lactococcus</i>	50
	• Cinétique de croissance des souches de <i>Leuconostoc</i>	54
5.2	Discussion.....	58
	Conclusion	60
	Références.....	61
	Annexes.....	68

Résumé

Le lait de chamelle constitue une source importante pour la sélection de nouvelles souches lactiques d'intérêt industriel. Notre thèse s'appuie sur la recherche de bactéries lactiques présentes dans le lait cru de chamelle d'ALGERIE. Les données bibliographiques révèlent que certaines bactéries lactiques possèdent des caractères thermophiles atypiques aux bactéries lactiques dites mésophiles.

Les techniques microbiologiques ont permis d'isoler un certain nombre de germes thermophiles, les analyses phénotypiques ont permis l'identification des espèces du genre *Leuconostoc* spp et *Lactococcus* spp.

Les espèces de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *biovar. diacetylactis* ont montré un caractère de thermophilie en poussant à 45°C. Leurs aptitudes technologiques ont été aussi recherchées par l'étude de la cinétique de croissance sur milieu lait. Une approche d'identification par leur profil protéique a été aussi entamé. Ce travail nous a permis de révéler la présence de bactéries lactiques à caractère atypique du lait cru de chamelle d'ALGERIE.

Mots clés : lait de chamelle, bactéries lactique, cinétique de croissance, cinétique d'acidification, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, thermophiles, protéines solubles, gel polyacrylamide SDS-PAGE.

Abstrat

Camel milk is an important source for the selection of new lactic strains of industrial interest. The purpose of our thesis is the research of lactic acid bacteria present in raw camel milk of Algeria. Bibliographic data reveal that some mesophilic lactic acid bacteria have atypical thermophilic characters.

Microbiological techniques were used to isolate a number of thermophilic bacteria, phenotypic analyzes led to the identification of species of the genus *Leuconostoc* spp and *Leuconostoc* spp..

Species *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *biovar. diacetylactis* showed thermophilic character pushing at 45 ° C. Technological skills have been sought by studying the kinetics of growth on milk medium. Approach by identifying their protein profile was also initiated. This work has allowed us to reveal the presence of atypical acid lactic bacteria in raw camel milk of Algeria.

Keywords: camel milk, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, thermophilic, SDS-PAGE.

ملخص

يمثل حليب الناقة مصدر هام لانتقاء سلالات جديدة من البكتيريا اللبنية التي لها دور هام الصناعة الغرض من هذا البحث هو عزل البكتيريا اللبنية الموجودة في حليب الناقة النئى بالجزائر. تبين المراجع بأن بعض البكتيريا اللبنية التي عادة تعيش في وسط حراري معتدل تحتل الحرارة المرتفعة.

سمحت التقنيات الميكروبيولوجية بعزل عدد من البكتيريا المحتملة للحرارة، كشفت التحاليل بأن هذه البكتيريا تنتمي إلى النوعين *Leuconostoc spp*, *Lactococcus spp*

الأنواع *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides subsp diacetylactis.cremoris*, *Lactococcus lactis subsp lactis biovar* لها خاصية تحمل الحرارة و النمو في 45⁰ م . درست الخصائص التكنولوجية عن طريق دراسة حركية النمو في وسط حليبي . درست البروتينات مكننت كذلك من التعرف على هذه الأنواع. مكننا هذا البحث من إيجاد بكتيريا ذات خصائص فريدة وهي تحمل الحرارة العالية عزلت من حليب الناقة بالجزائر

كلمات البحث: حليب الناقة، تحمل الحرارة، *Leuconostoc*, SDS-PAGE, *Lactococcus*

Abréviation

-ADN : acide désoxyribonucléique.

-ADH : arginine déshydrogénase.

-ATP : Adénosine Triphosphate.

-ARDRA : Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique.

-BHD : Biomasse des Herbivores Domestiques.

-BL : bactérie lactique.

-CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

-DGGE: *denaturing gradient gel electrophoresis*.

-EBI: European Bioinformatics Institute.

-EMBL: l'European Molecular Biology Laboratory.

-FAO: *Food and Agriculture Organization*.

-G : temps de génération.

-IRTF : infra-rouge à transformée de Fourier.

-MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

-PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*.

-pH : potentiel hydrogène.

-PTG: Peptidoglycanes.

-RDP: Ribosomal Database Project.

-rep-PCR: polymerase chain reaction.

-RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

-SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

-TTGE Temporal Temperature Gel Electrophoresis.

-μ : taux de croissance.

Liste des tableaux

-**Tableau 1:** Densité des dromadaires dans le monde Faye (1997)

Tableau 2 : Le développement des effectifs de la population caméline (FAO, 2008)

-**Tableau3 :** production de lait de chamelle par an (tonne) (FAO, 2006).

-**Tableau 4:** Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques

-**Tableau 5:** milieu utilise et condition d'isolement des bactéries lactiques

-**Tableau 6 :** caractéristiques physiologiques des souches isolées de lait de chamelle.

-**Tableau 7:**caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*

-**Tableau 8 :** représente les paramètres relatifs à la croissance de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (12L, 5Me) sur milieu lait écrémé à 37°C.

-**Tableau 9:** représente les paramètres relatifs à la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*cremoris* (S) sur milieu lait écrémé à 37°C.

Liste des figures

-**Figure1:** *Camelus dromedarius*

-**Figure2:** *Camelus bactrianus*

-**Figure 3 :** *Camelus ferus*

- **Figure 4 :** Population cameline dans le monde en 2003 (FAOSTAT).

-**Figure5 :** Aires de distribution des Camelins en Algérie (Ministère DE L'Agriculture).

-**Figure 6:** nombre de chamelles par rapport à l'effectif camelin en Algérie. M.A.D.R (2006).

-**Figure 7 :** production mondiale du lait camelin (FAO, 2006).

-**Figure 8 :** Schéma général du procédé d'extraction des protéines totale des bactéries lactiques.

- **Figure 9 :** vue en coupe d'une cuve d'électrophorèse verticale pour gel de polyacrylamide (Ghazi *et al.*, 2006)

-**Figure 10 :** colonies blanchâtre sur milieu MRS solide pH 6,8 à gauche, et culture sur bouillon MRS à droite

-**Figure 11 :** colonies de bactéries lactiques blanchâtres et d'autre grisâtre sur milieu M17.

-**Figure 12 :** production de gaz à partir de glucose sur milieu MRS sans extrait de viande.

-**Figure 13 :** recherches d'ADH chez les bactéries lactiques sur milieu M16BCP.

-**Figure 11 :** production de dextrane sur milieu MSE par la souche H (*Leuconostoc*).

-**Figure12 :** observation microscopique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) à gauche et *Leuconostoc* sp (W₁) à droite isolée du lait cru de chamelle sous forme de coque ovoïde en diplo et en chainettes.

- **Figure 16a :** Profile des protéines totales par SDS-PAGE, ligne 1: *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa), ligne 2 : *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar *diacetylactis* (12L), ligne 3 : *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar *diacetylactis* (5Me), ligne 4 : *Leuconostoc.mesenteroides* subsp.*cremoris* (S).

-Figure 16b : Le profil protéique total des souches de *Leuconostoc* (L4, 43, 27) et *Weissella paramesenteroides* (13, 6) isolées à partir du lait cru de chèvre (GHAZI et al 2006).

-Figure 17 : évolution de la croissance en fonction du temps de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

-Figure 18 : Evolution de l'acidité dornic en fonction du temps des souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé incubé à 37°C.

-Figure 19 : Evolution du pH en fonction du temps des souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

-Figure 20 : évolution de la croissance en fonction du temps de *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

-Figure 21: Evolution de l'acidité dornic en fonction du temps des souches *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

-Figure22 : Evolution du pH en fonction du temps des souches *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

INTRODUCTION

Introduction

Le lait de chamelle constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuples nomades qui le consomment habituellement à l'état cru ou fermenté. Il est considéré comme l'aliment de base pour une période annuelle prolongée, dans la plupart de ces zones pastorales sahariennes. En Algérie le peuple du sud a su le conserver sous forme asséché appelé Klila consommé notamment lors des longs voyages.

L'appui au développement de la production laitière caméline, souvent marginale dans les projets consacrés aux régions arides, fait désormais partie intégrante des objectifs et des actions de la Division production et santé animales de la FAO. De plus, au travers du projet de coopération technique entre le Gouvernement français et la FAO, basé sur la promotion en Afrique de l'Ouest de la méthode de réactivation du système de la lactoperoxydase, un volet concernant le lait de chamelle a été spécialement mis en avant. De son côté, le Département d'élevage et de médecine vétérinaire du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD-EMVT), accompagne sur le plan technico-scientifique, les initiatives liées à la promotion du lait de chamelle dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie.

Plusieurs chercheurs porte de l'intérêt à l'étude des bactéries lactiques isolés du lait de chamelle, vu les conditions extrêmes des zones arides, ces dernières ont trouvé le moyen de s'adapter au stress thermique, hydrique. C'est dans ce sens que s'inscrit l'objectif de notre travail et qui est d'étudier la flore lactique et de caractériser parmi les souches isolées des espaces appartenant au genre *Lactococcus* et *Leuconostoc* pouvant se développer à 45°C, l'identification phénotypique des isolats et suivie de la caractérisation des protéines solubles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

CHAPITRE I-

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Aperçu sur le dromadaire

D'après **Wilson (1998)** l'histoire des camélidés remonte à l'Eocène moyen. Cependant, le genre considéré comme l'ancêtre en ligne directe des camélidés actuels est le *Protomeryx* apparu à l'Oligocène supérieur dans ce qui est aujourd'hui l'Amérique du Nord. Aujourd'hui, il est admis que l'ancêtre des Camélidés actuels existe depuis le Pléistocène supérieur, au début de la période glaciaire. **Faye (1997)** a signalé que les camélidés occupèrent rapidement les zones arides de l'hémisphère Nord et plusieurs représentants du genre *Camelus* sont répertoriés en divers point de l'Ancien Monde. Ainsi, ont pu être identifiés un *C. knoblochi* dans le Sud de la Russie et un *C. alutensis* en Roumanie. L'espèce apparemment la plus répandue à l'époque en Europe et en Asie semble être cependant la *C. thomasi*. Dans le Nord de l'Inde, dès le Pliocène, on trouve un *C. siwalensis* et un *C. antiquus*. Ce sont ces deux dernières espèces qui sont considérées comme étant les plus proches des espèces actuelles. Le dromadaire aurait pénétré en Afrique par le Sinaï jusqu'au Corne de l'Afrique, puis en Afrique du Nord jusqu'à l'Atlantique, il y a 2 ou 3 millions d'années. Cependant, d'après les données actuelles, il aurait disparu du continent africain pour n'y être réintroduit que beaucoup plus tard, à la faveur de la domestication.

1.1 Taxonomie des camélidés

Le dromadaire appartient au genre *Camelus* et à la famille des Camélidés. **Faye (1997)** a signalé que les Camélidés d'Asie, confrontés au froid et à l'aridité comme dans le désert de Gobi, évoluèrent en chameau à deux bosses : le chameau de Bactriane. Ceux qui se déplacèrent dans les régions chaudes et arides, Afrique et Moyen-Orient, évoluèrent en chameau à une bosse : le dromadaire. La famille des camélidés ne comprend que deux genres: *Camelus* et *Lama*. Le genre *Camelus* occupe les régions désertiques de l'Ancien Monde (Afrique, Asie et Europe) alors que le genre *Lama* est spécifique des déserts d'altitude du Nouveau Monde (les Amériques) où il a donné naissance à quatre espèces distinctes **Fig1 et2**.

Classification

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Classe : Mammalia

Sous-classe: Placentalia

Ordre : Artiodactyla

Famille : Camelidae

Genre : Camelus

Espèces :

- *Camelus dromedarius*
- *Camelus bactrianus*
- *Camelus ferus*



Figure1: *Camelus dromedarius*



Figure2: *Camelus bactrianus*



Figure 3 : *Camelus ferus*

1.2 Répartition géographique des dromadaires

1.2.1 Distribution dans le monde

Les espèces *Camelus dromedarius*, communément appelé dromadaire ou chameau à une bosse, et *Camelus bactrianus* ou chameau de Bactrien qui n'est autre que le chameau à deux bosses sont comparables. Au-delà de leur particularité anatomique, dromadaire et chameau de Bactriane se distinguent par leur aire de répartition géographique. Tandis que le premier est l'animal des déserts chauds d'Afrique, du Proche et du Moyen-Orient jusqu'au désert du Thar en Inde, le second est celui des déserts froids d'Asie Centrale jusqu'aux confins de la Mandchourie en Chine. Toutefois, les deux espèces peuvent cohabiter en quelques rares endroits (Faye, 1997).

La localisation géographique du dromadaire se situe dans la ceinture des zones tropicales et subtropicales sèches de l'Afrique, de l'Ouest du continent asiatique et du Nord-Ouest de l'Inde. Une implantation massive de dromadaires a été faite au siècle dernier en Australie, des introductions très ponctuelles ont également été réalisées aux Etats-Unis, en Amérique Centrale, en Afrique du Sud et en Europe (Wilson *et al.*, 1989). Selon Faye (1997) le dromadaire est répertorié dans 35 pays originaires s'étendant du Sénégal à l'Inde et du Kenya à la Turquie. L'aire originare de distribution du dromadaire est bien entendu associée aux caractéristiques climatiques du milieu compte tenu de l'adaptabilité remarquable de cette espèce aux conditions d'aridité. L'aire de distribution découle aussi d'un facteur social d'importance : le dromadaire est tout d'abord l'animal du nomade, célébré comme tel par le Coran, même si son utilisation par les bédouins de l'Arabie est antérieure à l'Islam.

Cependant, dans son extension à la faveur de l'expansion de l'Islam, le dromadaire du nomade a rencontré le cultivateur méditerranéen ou oasien, et s'est donc sédentarisé. Il n'en demeure pas moins que son aire de répartition recouvre celle des populations pastorales nomades ou transhumantes qui au cours de leur histoire l'ont adopté comme auxiliaire incontournable dans la mise en valeur des zones arides.

1.2.2 Distribution en Afrique

Il est difficile de connaître avec exactitude la population caméline mondiale, cela est lié à plusieurs facteurs comme l'absence de vaccination obligatoire pour cette espèce et la nature même des écosystèmes dans lesquels elle évolue, ce qui rend difficile le recensement de ces effectifs. Les chiffres proposés par la **FAO** s'appuient sur des estimations qu'un recensement exhaustif (**Fig 4**). La répartition mondiale de l'espèce caméline est fortement inégale, et elle est confinée dans la ceinture désertique et semi-aride d'Afrique et d'Asie (**Tableau 2**). Cependant, près de 80% de la population de dromadaire se situe en Afrique. Les pays de la Corne de l'Afrique (Somalie, Soudan, Ethiopie, Kenya, Djibouti) abritent seuls 60% du cheptel camelin mondial. La Somalie contient environ 6,5 millions de dromadaires, ce qui est proche de 50% du cheptel africain (**Faye, 1997**).

1.2.3 Densité des dromadaires

En fonction de l'effectif de dromadaires par rapport à la Biomasse des Herbivores Domestiques (BHD) quatre catégories ont été distinguées (**Faye, 1997**).

- ***Densité très faible***

Cette catégorie concerne les pays qui ont effectivement une population caméline peu nombreuse (effectif < 1% de la BHD) et dans lesquels l'élevage camelin constitue une activité mineure. En Afrique, il s'agit du Nigeria, du Sénégal et du Burkina-Faso qui se situent plutôt à la périphérie de l'aire de l'existence de l'espèce. En Asie, il s'agit de la Turquie, de la Syrie, de l'Iran et du Liban, pays dans lesquels l'élevage des petits ruminants (notamment ovins) s'avère prépondérant.

- ***Densité faible***

Elle concerne essentiellement les pays où l'effectif est compris entre 1 et 8 % de la BHD et dans lesquels l'élevage camelin représente une part importante de l'activité économique pour certains groupes de population. En Afrique, tous les pays d'Afrique du Nord, excepté la Tunisie, sont concernés (Maroc hors Sahara, Algérie, Libye, Egypte) ainsi que le Mali, l'Ethiopie et le Kenya. En Asie, les pays de cette catégorie sont le Pakistan, l'Afghanistan, l'Irak et Oman.

- ***Densité moyenne***

Cette catégorie renferme les pays dans lesquels l'élevage camelin constitue une part importante de l'économie agricole et l'effectif est compris entre 8 et 20% de la BHD. En Afrique du Nord seule la Tunisie est concernée. Mais on y retrouve surtout les pays sahéliens : Niger, Tchad et Soudan. En Asie, ce sont les pays de la péninsule arabique, berceau de l'espèce qui relèvent de ce groupe : Arabie Saoudite, Jordanie, Bahreïn, Koweït et Yémen.

- ***Densité forte***

Ce sont des pays, peu nombreux, où la place culturelle du dromadaire est centrale et l'effectif est supérieur à 20% de la BHD. Parmi les grands pays : En Afrique, la Somalie, la Mauritanie et dans les provinces sahariennes du Maroc et Djibouti. En Asie, ce sont les Emirats Arabes et Qatar qui relèvent de ce groupe. Bien entendu, l'économie caméline est dérisoire dans ces Etats par rapport à l'extraction pétrolière, mais le dromadaire est culturellement indéboulonnable en dépit des évolutions sociologiques liées à l'enrichissement de la population.

Tableau 1: Densité des dromadaires dans le monde Faye (1997)

Densité très faible effectif<1% de la BHD	Densité faible 1%<effectif<8% de la BHD	Densité moyenne 8%<effectif<20% de la BHD	Densité forte effectif>20% de la BHD
Nigeria Sénégal Burkina-Faso Turquie Syrie Iran Liban	Maroc <u>Algérie</u> Lybie Egypte Mali Ethiopie Kenya Pakistan Afghanistan Irak Oman	Tunisie Niger Tchad Soudan Arabie Saoudite Jordanie Bahreïn Koweït Yémen	Somalie Mauritanie Djibouti Emirats Arabes Qatar

BHD : Biomasse Herbivores Domestiques.

Tableau 2 : Le développement des effectifs de la population caméline (FAO, 2008)

	2004	2005	2006	2007	2008
Monde	23.397.667	23.517.490	24.109.924	24.265.916	24.732.032
Afrique	19.915.813	20.032.070	20.323.086	20.557.532	21.024.649
Asie	3.474.462	3.478.016	3.779.749	3.701.199	3.700.227

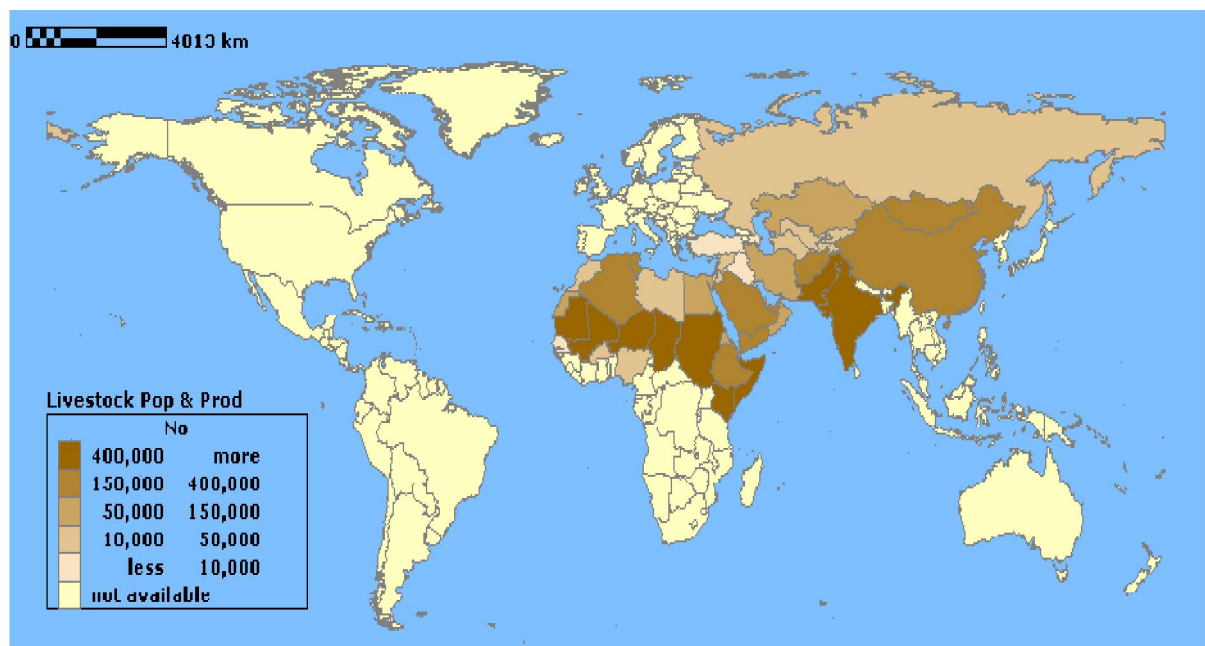


Figure 4 : Population cameline dans le monde en 2003 (FAOSTAT).

1.2.4 Répartition en Algérie

L'Algérie, compte actuellement un nombre considérable de dromadaire, la sécheresse des années soixante-dix, était l'une des causes principales qui a engendré à la dégradation du parcours, raison pour laquelle cet élevage est négligé en plus des difficultés de commercialisation, sont liées à la lenteur de la reproduction du troupeau.

La répartition du cheptel camelin est très hétérogène mais depuis une vingtaine d'années, on assiste à un mouvement général de repli vers le sud : le dromadaire partage donc de plus en plus souvent, et beaucoup plus qu'auparavant, les mêmes pâturages que les troupeaux des ovins et caprins.

- ***Comment le dromadaire est arrivé à notre pays?***

Les Berbères possédaient des dromadaires bien avant l'arrivée des Arabes et l'Islam, ces gens nomades vivaient avec leurs dromadaires. L'arrivée des Arabes, a introduit ou réintroduit les dromadaires Asiatiques dans le nord d'Afrique.

- ***La place du dromadaire en l'Algérie***

L'élevage camelin en Algérie n'a pas bénéficié d'une prise en charge effective durant les deux premières décennies qui ont suivi notre indépendance. Ce n'est qu'en 1986 que les autorités publiques ont pris conscience de l'importance et du rôle social et économique de cet élevage dans les régions steppique et sahariennes.

- ***Evolution numérique du cheptel camelin en Algérie***

Les effectifs du dromadaire en Algérie étaient estimés à 260 000 têtes en 1890, cet effectif a chuté à 194 000 en 1910 à cause de la destruction occasionnelle par l'Armée Coloniale lors de sa pénétration dans le sud. En 1986, les effectifs du dromadaire en Algérie étaient estimés à 141 000 têtes, cette régression peut être expliquée par la mécanisation des moyens de transport et l'abattage massif incontrôlé. Le festival des camelins, AMNI a pu rassembler 8000 chameaux sur les 170 000 têtes de l'effectif de la wilaya du Tamanrasset, soit 05%. **Anonyme AMNI (2012).**

- ***Répartition du cheptel national***

Le dromadaire est répertorié dans 17 Wilayas, en se basant sur des données statistiques du **MADR (2006)**, 92.15% du cheptel dans huit Wilayas sahariennes, et le reste dans neuf Wilayas steppiques. Pour bien préciser la répartition géographique du cheptel camelin dans notre pays, on distingue trois grandes aires de distribution. La première aire de distribution, est le Sud-est: El-oued, Biskra, Tébessa, Batna, Ouargla, Ghardaïa, Laghouat et Djelfa. La deuxième aire, est le Sud-ouest représentée par : Bechar, Tindouf, Naama, El- Bayadh, Tiaret et le nord d'Adrar ; L'extrême sud, c'est la troisième aire de distribution : Tamanrasset, Illizi, Djanet le sud d'Adrar.

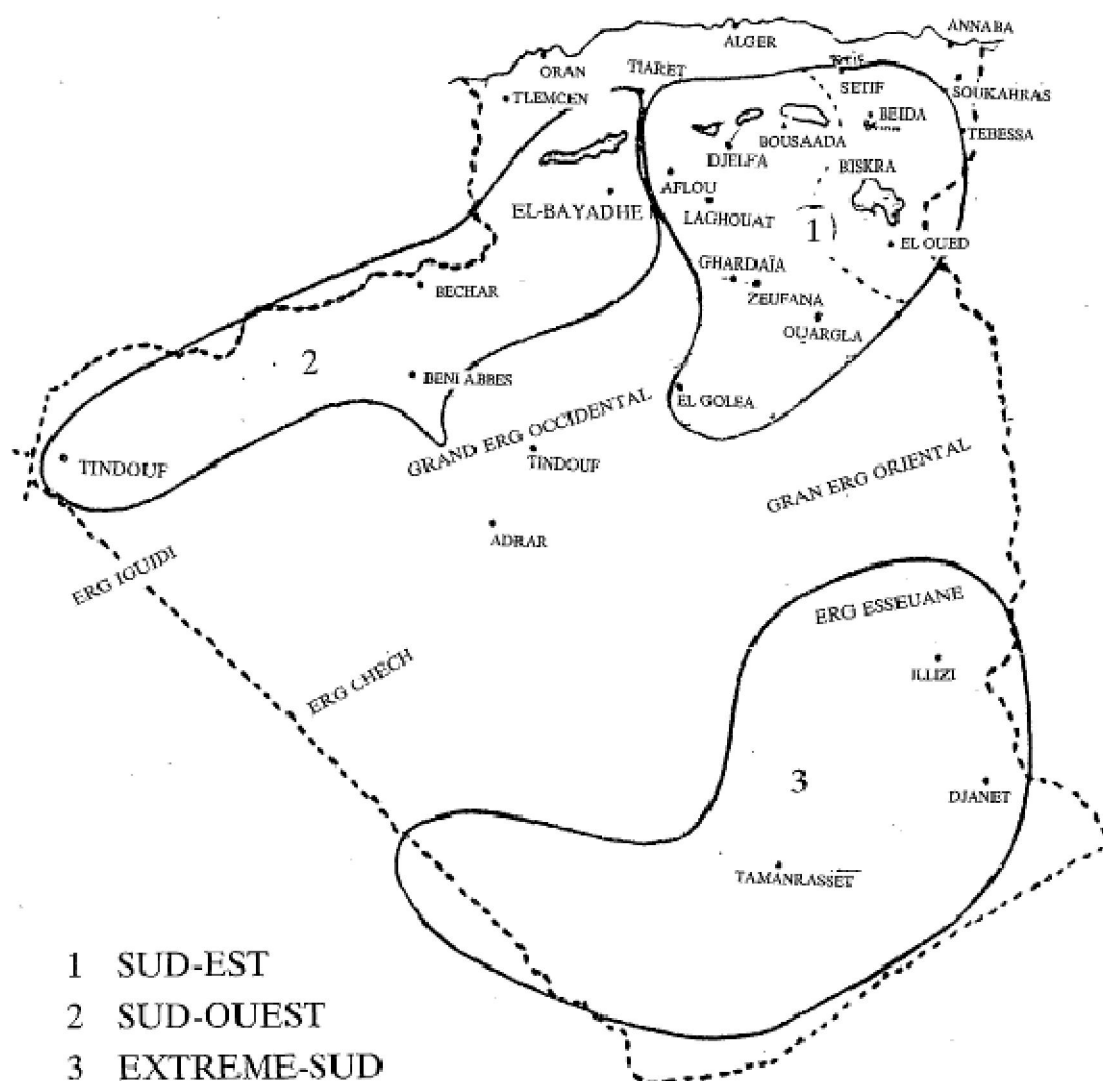


Figure5 : Aires de distribution des Camelins en Algérie (Ministère DE L'Agriculture)

- *L'élevage des chamelles laitières en Algérie*

La chamelle est répartie sur 17 Wilaya **Fig. 6**, avec près de 92% soit 155961 têtes dans les huit Wilaya sahariennes, et les 5% restant (12511 têtes) dans les neuf Wilaya steppiques (M.A.D.R, 2006).

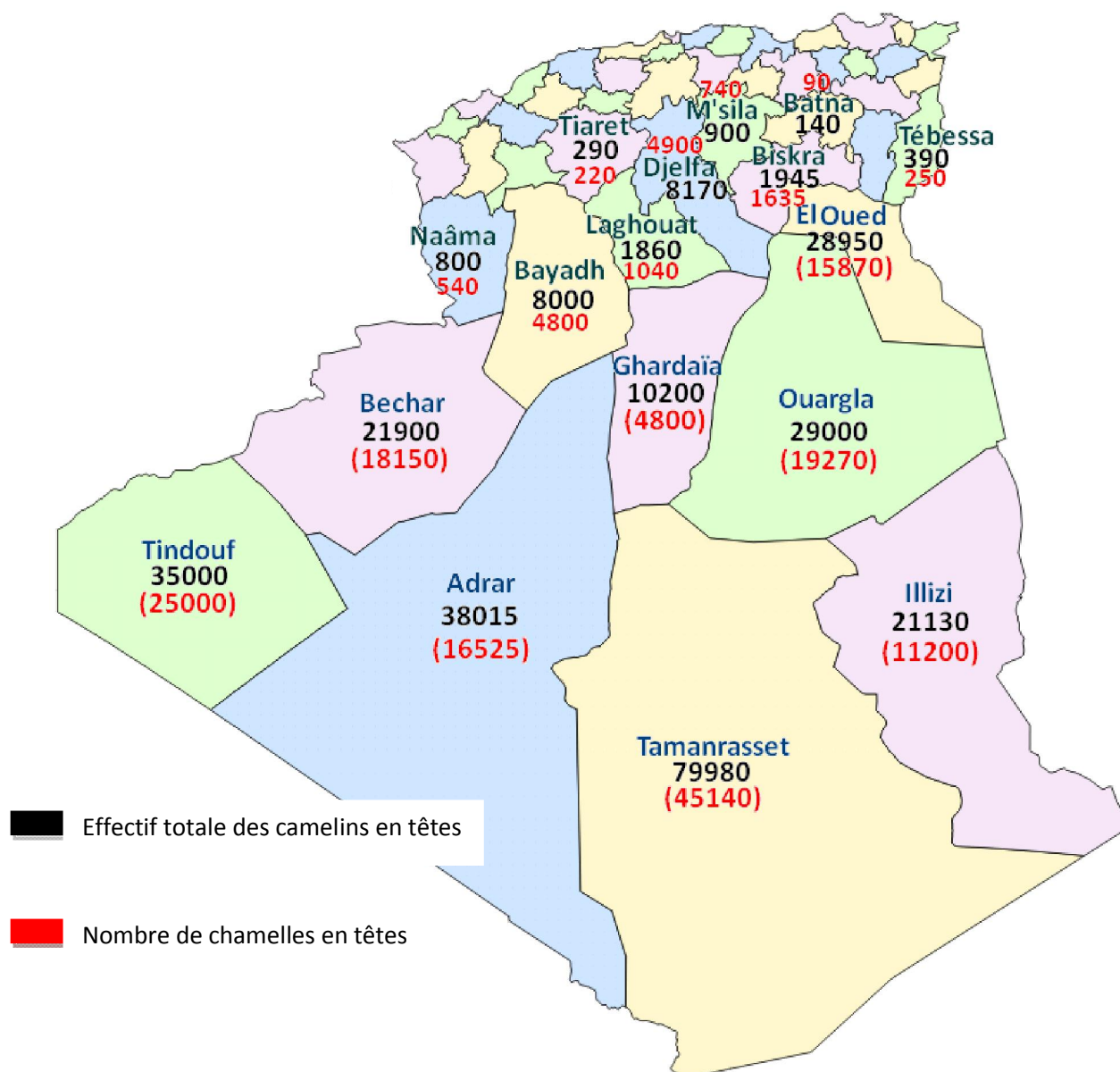


Figure 6: nombre de chamelles par rapport à l'effectif camelin en Algérie. M.A.D.R (2006).

Les réserves camélines nationales connaissent une évolution constante, dont elles comptent près de 290 milles têtes en 2008. Cette évolution s'accompagne avec une augmentation de l'effectif des chamelles productrices de lait (FAO, 2008).

2. La production laitière cameline

Celle-ci présente un double enjeu de développement local et de recherche. La production mondiale de lait de chamelle (**Fig 7, Tabl. 3**) est de l'ordre de 5,4 millions de tonnes **Faye (2004)**, mais la majeure partie de cette production est autoconsommée par des populations vivant au sein de régions éloignées de tout bassin de consommation. Toutefois, la croissance urbaine dans les régions désertiques, induisant des changements de comportement alimentaire et économique des consommateurs citadins, a accéléré la marchandisation d'un produit traditionnellement voué au don. Simultanément se sont donc développées des mini laiteries dans les villes des régions désertiques (Mauritanie, Niger, Kenya, Algérie, Maroc, Émirats Arabes Unis, Arabie Saoudite, ...) et un élevage laitier camelin périurbain pour satisfaire la demande locale. D'un mode classiquement hyper extensif, l'élevage camelin a subi une radicale évolution vers l'intensification se traduisant par des changements fondamentaux dans la gestion des unités de production : diffusion de l'insémination artificielle, voire du transfert d'embryon, réduction de l'intervalle entre mise bas, alimentation hors-sol, rations riches en concentrés, traite mécanique, sevrage précoce, accélération du taux de réforme, sélection des meilleures laitières. Les conséquences d'une telle évolution sont loin d'être anodines pour la recherche :

- a) Espèce à cycle reproductif lent (maturité tardive, gestation de treize mois, intervalle entre mises bas de deux ans), l'amélioration des performances par le développement des biotechnologies de la reproduction et son adaptation à une espèce peu prolifique est un enjeu essentiel pour les physiologistes et les zootechniciens cherchant à intensifier le cycle de reproduction. Citons notamment les travaux visant à améliorer le faible taux de survie des spermatozoïdes dans les paillettes congelées (**Deen et al., 2004**).
- b) Herbivore à la physiologie digestive adaptée aux fourrages pauvres et au recyclage de l'urée, l'accès à une alimentation plus riche en énergie rapidement fermentescibles et en protéines de haute qualité induit des risques de troubles alimentaires accrus et nécessite un approfondissement des recherches sur les besoins nutritionnels et les déséquilibres alimentaires qui s'avèrent très différents des bovins **Jouany (2000)**.
- c) Animal laitier à faible production citernale (moins de 20 %), son adaptation à la traite mécanique nécessite une préstimulation appropriée s'appuyant parfois sur l'injection d'ocytocine (**Ayadi et al., 2009**)

d) Espèce ayant subi une faible pression de sélection, elle manifeste néanmoins un potentiel laitier non négligeable mis à profit dans le contexte de changement des systèmes de production laitier :

Les résultats sur la productivité laitière ont été probants puisque si les productions moyennes se situent autour de 2500 litres par an (la lactation chez la chamelle dure de 12 à 18 mois), des rendements atteignant 9000 litres sont décrits pour des races sélectionnées, comme, par exemple, la race *Al-Majaheem* en Arabie Saoudite **Faye(2004)**. Des fermes laitières modèles, sur des bases modernes, se sont ainsi mises en place dans les pays pétroliers (robot de traite, alimentation raisonnée, gestion intensive de la reproduction, sélection des meilleures laitières).

Des recherches sont en cours pour identifier des biomarqueurs (gènes candidats) de la production laitière chez la chamelle. Il s'agit d'analyser les profils de gènes d'expression au cours de la lactation et du développement mammaire afin d'évaluer le potentiel laitier des animaux et d'accélérer la sélection. De tels projets, basés sur une approche transcriptomique, se mettent en place, notamment dans les pays du Golfe, sur la base des travaux réalisés dans d'autres espèces (**Sumner et McNamara, 2007**).

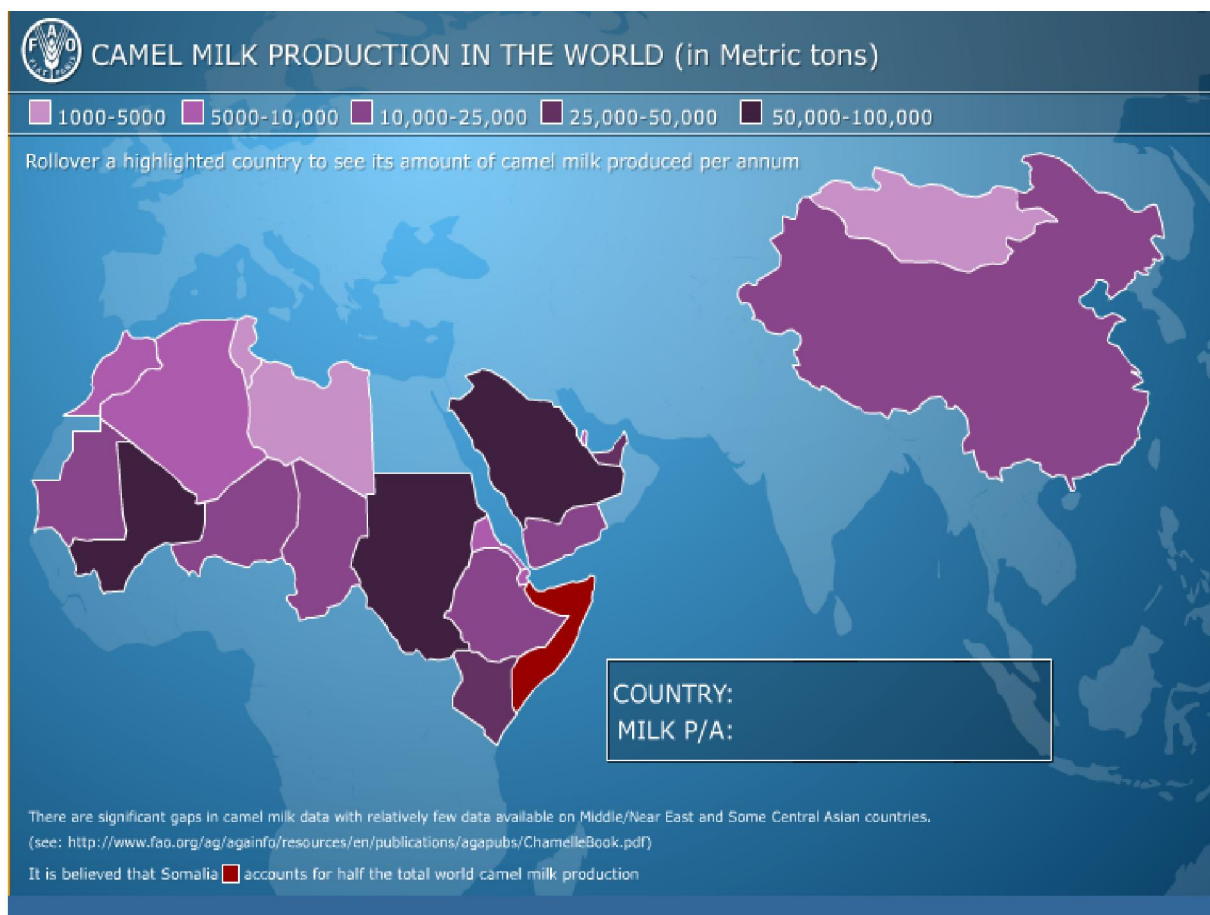


Tableau3 : Production de lait de chamelle par an et par pays en tonne (FAO, 2006).

Pays	Quantité de lait	Pays	Quantité de lait	Pays	Quantité de lait
Tunisie	1000	Niger	10800	Soudan	82250
Mongolie	1000	Yémen	13600	Émirats	39350
Tchad	2205	Chine	14400	Mali	55200
Maroc	3800	Mauritanie	22000	Arabie saoudite	90000
Erythrée	5100	Ethiopie	23500	Somalie	850 000
Djibouti	5900	Kenya	25200		
Algérie	8100				
Qatar	9900				

2.1 Caractéristiques du lait de chamelle

2.2 Qualité microbiologique du lait camelin

Le lait de chamelle est caractérisé par la dominance de la flore lactique mésophile ce groupe est représenté par l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, cette souche peut présenter un intérêt particulier dans l'industrie laitière car elle détient à la fois le caractère acidifiant et la capacité de produire des composés aromatiques; les sous-espèces de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produisent plus de 100mM d'acide lactique après 24h d'incubation à 30°C, la flore lactique thermophile représente un taux maximal de 18.10^4 ufc/ml et baisse le pH jusqu'à 4,2 après huit jours d'incubation à 45°C. Cette flore est représenté par deux espèces, *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus faecalis* (Kihal *et al.*, 2000) et (Saidi.Dj *et al.*, 2005), d'autre travaux ont révélé la présence de souches atypiques, des lactocoques poussant à 50°C (Drici *et al.*, 2009) et des souches de *Lactobacillus plantarum* poussant à 45°C (Boumehira *et al.*, 2011).

3. Les bactéries lactiques

3.1 Introduction

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté).

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait Novel (1993).

3.2 Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels.

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par **Lister** en **1873** et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (**Sandine, 1988**).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (**Jones, 1978**).

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification (**Suhigara, 1985**) et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (**Devoyod et Poullain, 1988**). **Boubekri et Yoshiyuki (1996)** ont isolé deux souches de *Leuconostoc* sp. à partir de fromage traditionnel El-Klila fabriqué à Batna (Algérie). Tandis que (**Ryhänen et al., 1996**) ont identifié trois espèces (*Leuconostoc curvatus*, *Ln. Citreum* et *Ln. Mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*) isolées à partir de blé fermenté.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents :

Dans le lait et les fromages (*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (**Desmazeaud, 1996**).

3.3 Utilisation industrielle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles peuvent fermenter une grande variété de substrats (**Tableau4**).

Tableau 4 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques.

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourt, laits fermentés, fromages
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, Kéfir
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	Choucroute, olives
	Lait	Fromages, Kéfir
<i>Pediococcus</i>	Végétaux	Choucroute
	Viande	Saucisses semi-séchées
<i>Lactobacillus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, Kéfir, fromages
	Viande	Saucissons secs
	Végétaux	Choucroute, olives, yaourts au lait de soja
	Céréales	Pain au levain
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Weissella</i>		
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	
<i>Carnobacterium</i>	viandes	

Les BL ont plusieurs rôles dans la production de produits fermentés. Tout d’abord, les BL vont permettre de changer la saveur de l’aliment et sa texture. Ces changements sont dus notamment à l’acide lactique produit au cours de la croissance. D’autre part, les BL produisent des peptides et des molécules comme l’acétoïne, l’acétaldéhyde, le diacétyle ou l’éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments. Un autre rôle des BL est d’inhiber le développement de la flore bactérienne indésirable qu’elle soit pathogène ou d’altération. Cette inhibition passe par deux aspects : l’acidification qui inhibe la croissance des bactéries peu résistantes à un bas pH, et la synthèse de bactériocines, molécules bactéricides dont les spectres d’action sont variables (Anas *et al.*, 2012) et (Saidi *et al.*, 2011)

Certaines BL comme *L. helveticus* sont utilisées pour produire industriellement de l’acide lactique employé comme additif en alimentation et dans les produits cosmétiques ou pharmaceutiques. L’acide lactique est aussi transformé en acide polylactique, polymère

biorésorbable utilisé dans la fabrication d'implants pour la chirurgie osseuse ou pour la fabrication de films plastiques biodégradables. *Leuconostoc mesenteroides* est utilisé pour la production de dextran, médicament utilisé dans les cas d'hypovolémie sanguine.

4.2. Identification des bactéries lactiques

Les bactéries sont classées en groupes taxonomiques, ou taxons, en fonction de critères qui évoluent selon les données disponibles. L'espèce, qui est le groupe de base dans les classements bactériens, est un concept évolutif non encore arrêté par une définition universellement admise.

4.2.1. Notion d'espèce bactérienne

La reproduction sexuée, qui est à la base de la définition de l'espèce dans les règnes animal et végétal, est rare chez les bactéries ; seuls quelques groupes, dont les coliformes, sont capables de conjugaison. Par sa rareté, le critère de reproduction sexuée s'est rapidement révélé inadéquat pour rendre compte de la diversité microbienne impliquée dans les applications pratiques de la microbiologie. C'est en conséquence en fonction de caractéristiques liées à ces applications - phénotypiques (réactions biochimiques), morphologiques et de pathogénicité - et de la source d'isolement que les premiers classements bactériens ont été effectués. L'espèce se définit alors de facto comme un ensemble de micro-organismes présentant suffisamment de similarité entre-eux et se différenciant des autres (Staley et Krieg, 1984).

Jusque dans les années 1960, la classification bactérienne reposait sur un petit nombre de critères dont le choix était souvent orienté par les connaissances et présomptions du microbiologiste qui décrivait l'espèce. La prise en compte d'un ensemble plus large de caractéristiques morphologiques et biochimiques pour caractériser les espèces est introduite dans ces années-là. Dix ans plus tard, l'informatisation améliore la validité de cette classification en autorisant le traitement d'un plus grand nombre de tests biochimiques (100-200) et le calcul de coefficients de similarité entre les espèces et leurs composantes microbiennes. Elle ne permet toutefois pas d'objectiver la définition de l'espèce par un seuil de similarité phénotypique (Brenner *et al.*, 2005).

Parallèlement, le développement d'outils permettant de comparer le génome des bactéries introduit un nouveau critère de classification : la similitude de leurs ADN. Techniquement, le génome bactérien peut aujourd'hui être comparé au niveau de sa

composition nucléotidique (pourcentage en cytosine et en guanine), par le biais de sa capacité d'hybridation, par l'intermédiaire de l'empreinte révélée par une méthode déterminée et au niveau de la séquence nucléotidique de gènes particuliers dont celui codant pour l'ARN ribosomique 16S (**Gillis *et al.*, 2005**).

Deux paramètres génotypiques fournissent à la classification bactérienne des critères de spéciation objectifs, considérés comme la référence en matière de définition de l'espèce par les comités d'experts internationaux en systématique bactérienne (**Stackebrandt *et al.*, 2002**) : le taux d'hybridation de l'ADN dénaturé (simple brin) provenant de deux bactéries et la stabilité thermique de l'ADN hybride (double brin) formé. Le taux d'hybridation et la valeur du paramètre de stabilité thermique déterminant l'espèce ont été fixés en fonction de la classification existante ; ce sont, comme le précise **Stackebrandt (2003)**, des "valeur(s) artificielle(s) utilisée(s) pour structurer le monde bactérien de façon cohérente".

La séquence de l'ADNr 16S fournit une assise plus "naturelle" à la classification bactérienne dans le sens où elle intègre une composante relative à la phylogénie bactérienne. L'ARN ribosomique 16S, parce qu'il a un rôle clé dans la traduction des ARNs messagers en protéines, est présent dans tous les micro-organismes et offre une structure mosaïque incluant des régions conservées et des régions variables, reflets d'événements de mutation plus ou moins lointains liés à leur spéciation (**Woese, 1987**). Cet outil taxonomique est reconnu et utilisé en systématique bactérienne : la dernière édition (**2005**) du **Bergey's manual of systematic bacteriology**, qui est un ouvrage de référence en matière de classification bactérienne, est structurée sur base des relations phylogénétiques établies à partir du gène codant pour l'ADNr 16S. Cependant, le taux d'homologie de l'ADNr 16S des bactéries n'est pas toujours corrélé avec le taux d'hybridation de l'entièreté de l'ADN génomique (**Stackebrandt et Ebers, 2006**) et ne peut dès lors se substituer à ce critère décisif dans la définition de l'espèce proposée par les comités d'experts précités.

Si le taux d'hybridation de l'ADN dénaturé provenant de deux bactéries et la stabilité thermique de l'ADN hybride formé constituent la référence en matière de définition de l'espèce, ils ne suffisent pas à eux seuls pour la déterminer. Pour être reconnue comme telle, une espèce doit aussi pouvoir se distinguer des autres par des caractères phénotypiques (**Stackebrandt *et al.*, 2002**). Les critères phénotypiques utilisés en taxonomie polyphasique pour distinguer les espèces bactériennes entre-elles concernent, notamment, des caractères visibles d'ordre morphologique, physiologique, enzymatique et/ou sérologique, des marqueurs

chimiotaxonomiques (exopolysaccharides, peptidoglycane, quinones, lipides polaires, acides mycoliques...) et le comportement électrophorétique des protéines cellulaires ou membranaires (**Gillis *et al.*, 2005**). La pertinence des critères varie selon le groupe microbien considéré : la capacité à fermenter différents sucres est un critère pertinent pour différencier les espèces lactiques mais n'a pas de sens pour différencier des *Campylobacter* sp. (elles sont incapables d'utiliser les sucres) par exemple.

La définition de l'espèce proposée par les comités d'experts précités rend peu compte du rôle écologique des bactéries ; si bien qu'elle reconnaît des exceptions à la règle, notamment dans le domaine sensible de la microbiologie médicale (**Stackebrandt *et al.*, 2002**). Ainsi, *Yersinia pestis* (agent de la peste) et *Y. pseudotuberculosis*, appartiennent, par rapport à cette définition, à la même espèce mais sont nommées distinctement pour éviter une confusion au niveau de la pathogénicité (**Brenner *et al.*, 2005**).

Pour pallier cette carence, **Cohan et Perry (2007)** proposent d'asseoir une définition de l'espèce bactérienne sur un concept de cohésion génomique à l'image de celui ordonnant les règnes animal et végétal. Les niches écologiques spécifiques joueraient dans le monde bactérien le rôle sélectif que l'impossibilité de se reproduire opère dans les règnes animal et végétal. Partant de ce postulat, les membres d'une communauté bactérienne ayant des rôles écologiques distincts, ou "écotypes", sont identifiés au travers de la fonctionnalité d'un groupe de gènes (codant pour des protéines). L'équipe de Cohan propose différents modèles d'évolution bactérienne, dont un disponible sur **Internet (Koeppel *et al.*, 2008)**, permettant d'identifier les écotypes d'une communauté bactérienne. Ces modèles sont toutefois contestés par **Achtman et Wagner (2008)** qui prônent une définition plus large de l'espèce, indépendante d'une méthode d'analyse et d'un critère universel.

4.2.2. Identification microbienne

L'identification est le procédé par lequel l'appartenance d'un isolat à l'un ou l'autre taxon est déterminée. Elle repose sur un ensemble de caractéristiques que tous les membres du taxon possèdent et que les autres taxons ne possèdent pas (**Krieg, 2005**).

4.2.3. Méthodes phénotypiques

Par bactéries lactiques on entend communément des bactéries anaérobies aérotolérantes dont le, ou un des, produit(s) du métabolisme fermentaire est de l'acide lactique. Elles sont Gram positives, catalase négatives, généralement non mobiles et non sporulées (**Wood, 1995**).

Les caractéristiques phénotypiques répertoriées par **Curk et al. (1994a)** pour les identifier comprennent la morphologie cellulaire, la production d'exopolysaccharide ou de pigment, la température et le pH optimaux de croissance, la tolérance au NaCl, à la bile ou à d'autres inhibiteurs, le type fermentaire (déterminé par la production de CO₂ en milieu glucosé), l'isomère optique de l'acide lactique produit par fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, de l'hippurate, de l'esculine, de l'amidon et de l'urée, et le profil de fermentation des sucres.

Biomérieux (Marcy-l'Etoile, France) commercialise depuis les années 70 un ensemble de tests biochimiques miniaturisés spécifiquement destiné à l'identification des bactéries lactiques (galerie API 50 CHL). L'interprétation de l'ensemble de ces résultats est assistée par une grille d'identification disponible sous forme de document papier ou informatisé. Cet outil d'identification n'est toutefois pas toujours fiable au niveau taxonomique de l'espèce, ni même au niveau du genre : appliqué seul à l'identification de souches bactériennes commerciales il a conduit dans 8 cas sur 27 à une spécification erronée (**Huys et al., 2006**).

Les méthodes phénotypiques ne permettent par ailleurs pas de différencier toutes les bactéries lactiques : celles autrefois associées à *Lactobacillus acidophilus*, ou encore *Lb. brevis* et *Lb. kefir*, sont indiscernables sur une base phénotypique (**Hammes et Vogel, 1995**).

4.2.4. Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques appliquées, ou qui offrent des perspectives d'application, aux bactéries lactiques reposent sur l'analyse de composants cellulaires particuliers, les protéines, ou de l'ensemble des composants cellulaires.

- **Profils protéiques**

Une cellule bactérienne synthétise environ 2000 protéines différentes qui fournissent une source riche d'information pour sa caractérisation et son identification. La séparation du

mélange de protéines cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE), avec ou sans dodécyl sulfate de sodium (SDS), produit un électrophorégramme ou profil protéique complexe qui peut être considéré comme l'empreinte de la souche bactérienne examinée (**Curk *et al.*, 1994a**). Les profils protéiques peuvent être digitalisés et ainsi comparés sur une base numérique objective. Avec une méthode SDS-PAGE strictement normalisée, l'équipe de l'Université de Gand (Belgique) et ses collaborateurs discriminent fiablement les bactéries lactiques aux niveaux de l'espèce et de la sous-espèce (**Vandamme *et al.*, 1996**).

La digitalisation des profils protéiques permet de les conserver pour constituer des banques de données de référence. L'identification de souches bactériennes par comparaison avec les données conservées implique une normalisation des profils protéiques qui, apparemment, n'est pas universelle : les différents groupes de recherche travaillent avec leur propre banque de données (**Tae-Woon *et al.*, 2003**).

- ***Spectres infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)***

Les propriétés d'absorption des cellules bactériennes entières dans le moyen infra-rouge (500 à 4000 cm^{-1}) fournissent des spectres IRTF spécifiques à chaque souche et reproductibles (**Naumann *et al.*, 1988**). Il s'agit d'une méthode rapide qui requiert peu de préparation : la préparation de l'échantillon se résume à l'étalement et la dessiccation d'une culture cellulaire sur un support adéquat (**Curk *et al.*, 1994a**).

Le spectre IRTF d'une bactérie est fonction de sa composition cellulaire et dépend dès lors, notamment, des conditions de culture. Dans des conditions normalisées de culture, de préparation de l'échantillon et de prise spectrale, les spectres IRTF permettent de discriminer les bactéries lactiques testées au niveau du genre et de l'espèce (**Curk *et al.*, 1994b** ; **Dziuba *et al.*, 2007**). Ces performances taxonomiques ont été établies à partir de souches de collection appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Weisella*.

4.2.5. Méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques d'identification reposent sur les similitudes de l'ADN, total ou de gènes ciblés, de deux souches. Un atout majeur de ces méthodes est l'indépendance du résultat vis-à-vis des conditions de culture.

- ***Hybridation ADN-ADN et stabilité thermique des hybrides***

Le taux d'hybridation de l'ADN total de deux souches et la stabilité thermique de l'hybride formé sont des paramètres de référence en matière de définition de l'espèce. Plusieurs méthodes permettent de les déterminer. Les plus communes selon (**Vandamme *et al.*, 1996**) sont la méthode à l'hydroxyapatite (**Brenner *et al.*, 1969**), la méthode spectrophotométrique (**De Ley *et al.*, 1970**) et la méthode basée sur une digestion de l'ADN à la nucléase S1 décrite par (**Crosa *et al.*, 1973**) puis améliorée par **Grimont *et al.*, 1980**). La méthode spectrophotométrique présente l'avantage, par rapport aux deux autres, d'être affranchie de radio-isotope mais ne permet pas de déterminer le paramètre de stabilité thermique de l'ADN hybride. Ces méthodes classiques requièrent toutes de grandes quantités d'ADN et sont fastidieuses à mettre en œuvre. Des méthodes miniaturisées, plus rapides, ont été développées (**Mehlen *et al.*, 2004**). Comparées aux méthodes classiques, elles conduisent à une bonne corrélation des résultats pour les souches testées.

- ***Séquençage de l'ADNr***

La comparaison de la séquence nucléotidique de gènes discriminants est une technique d'identification bactérienne dont le succès a été promu par le développement d'outils analytiques performants. Le séquençage de gènes est en effet aujourd'hui une technique partiellement automatisée, permettant de lire rapidement des séquences relativement longues par rapport à celles autorisées par la traditionnelle méthode de Sanger. Les instruments modernes de séquençage automatique de l'ADN sont capables de lire simultanément jusqu'à 384 échantillons d'environ 700 bases en moins de 2 heures (**Wiebe *et al.*, 2003**).

Parallèlement à cette évolution technologique, différentes organisations ou universités ont constitué des banques de séquences, incluant celles de souches connues, qu'elles mettent à la disposition du public par le réseau Internet. Celle du Genbank ou de l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL), sont générales, c'est-à-dire comprennent des séquences de tous les gènes, tandis que celles émanant du Ribosomal Database Project II (RDP) géré par l'Université du Michigan (USA) et de l'European Ribosomal RNA Database géré par l'Université de Gand (Belgique) compilent exclusivement les séquences de l'ARN ou de l'ADN ribosomique. La banque émanant du RDP comprend actuellement 513.272 séquences (**Anonyme RDP, 2008**) tandis que celle de l'European Ribosomal RNA Database en comprenait 20.000 en 2004 (**Wuyts *et al.*, 2004**). Elles mettent par ailleurs à la disposition du public des outils informatiques facilitant la comparaison des séquences et permettant de

rechercher les séquences les plus similaires à celle de la souche à identifier au sein d'une banque de données. Ces outils sont accessibles par le réseau Internet et fournissent immédiatement le résultat de la recherche. Le logiciel FASTA par exemple de l'European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) recherche au sein de la banque de l'EMBL les séquences les plus proches de celle introduite et affiche l'alignement de chacune de ces séquences proches avec celle introduite ainsi que divers paramètres relatifs au taux d'homologie entre les séquences. Les logiciels Seqmatch et Classifier du Ribosomal Database Project II (RDP) fonctionnent de façon similaire mais ne fournissent que le résultat final de la recherche comparative, c'est-à-dire l'attribution de la séquence à identifier à un taxon, sans accès au détail des alignements, amputant ainsi la possibilité d'effectuer une analyse critique du résultat.

Parmi les gènes utilisés à des fins d'identification bactériennes, celui codant pour l'ARN ribosomique 16S présente l'avantage d'être à la base des relations phylogénétiques qui servent d'épine dorsale à la taxonomie contemporaine. Il n'existe toutefois pas de seuil universel d'homologie entre deux séquences de l'ADNr 16S permettant d'affirmer l'identification de la souche bactérienne. Au-delà de ~ 99 % d'homologie, les séquences peuvent aussi bien provenir de souches appartenant à la même espèce que de souches appartenant à des espèces distinctes (**Stackebrandt et Ebers, 2006**).

- ***Typage moléculaire***

De nombreuses méthodes permettant de typiser des bactéries à partir de leur ADN ont été décrites. Les bactéries inconnues sont dans ces cas identifiées par comparaison de leur empreinte, ou profil produit par la méthode appliquée, avec celles de bactéries identifiées.

Les méthodes de typage moléculaire de première génération reposent sur l'analyse des profils obtenus par migration en gel d'agarose de l'ADN digéré (fragmenté) par des enzymes déterminées (RFLP). Sous un champ électrique (électrophorèse), les fragments d'ADN migrent dans le gel à des vitesses inversement proportionnelles à leur longueur et se séparent pour donner, après une durée déterminée, un profil de bandes typique du set de fragments.

Les profils RFLP peuvent être établis à partir de l'entièreté de l'ADN génomique, à partir d'une partie ciblée de l'ADN génomique, gènes codant pour des protéines ou pour l'ARN ribosomique (ARDRA) par exemple, ou, pour les souches dotées de plasmides stables, à partir d'ADN plasmidique. Dans tous les cas, la qualité de l'ADN soumis à la restriction

enzymatique est un facteur déterminant et son acquisition peut se révéler fastidieuse quand il s'agit de l'entièreté de l'ADN génomique.

Appliquée à l'entièreté de l'ADN génomique, cette technique présente l'inconvénient additionnel de générer des profils complexes difficiles à interpréter. Le nombre de fragments et la complexité des profils, peuvent être limités par l'emploi d'enzymes de restriction agissant en des sites rares. La longueur des fragments obtenus impose alors de les séparer par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Une alternative appliquée aux bactéries lactiques, par **Chagnaud *et al.* (2001)** notamment, est la mise en évidence des fragments provenant d'un gène ou d'un ensemble de gènes particulier comme l'ADNr (Ribotyping) à l'aide de sondes marquées. Cette option impose alors de transférer le profil obtenu en gel sur une membrane synthétique pour pouvoir hybrider la sonde avec l'ADN cible.

Les méthodes RFLP peuvent se révéler très discriminantes : mises en œuvre à partir de l'entièreté de l'ADN génomique en utilisant des enzymes de restriction en sites rares (PFGE) ou à partir de gènes codant pour des protéines, elles permettent de différencier les bactéries lactiques auxquelles elles ont été appliquées au niveau de la souche (**Cai *et al.*, 2007 ; Oguntinyinbo, 2007**).

Les méthodes de typage moléculaire plus récentes reposent sur la technique d'amplification génique, ou Polymerase chain reaction (PCR). La PCR est une technique de réplification de l'ADN compris entre deux séquences déterminées par les amorces (oligonucléotidiques) de la réaction en chaîne.

Certaines méthodes consistent en l'amplification de fragments d'ADN génomique déterminés par des amorces non spécifiques, arbitraires (AP, RAPD ou DAF), ou par des séquences consensus répétitives (rep-PCR). Les fragments générés, de longueur variable, sont séparés par migration électrophorétique dans un gel (d'agarose ou de polyacrylamide) et forment une empreinte typique du taxon ou de la bactérie. L'identification de bactéries lactiques au niveau de l'espèce et de la sous-espèce ainsi que la différenciation de souches lactiques par ce type de méthodes ont été rapportées (**Masco *et al.*, 2003**).

D'autres méthodes consistent en l'amplification d'une région déterminée de l'ADN génomique dont le polymorphisme nucléotidique est révélé en exploitant les propriétés de dissociation de l'ADN. La dissociation de l'ADN, provoquée par une augmentation de la température ou par un agent chimique, transforme le fragment en une structure partiellement

ouverte et crée une diminution brutale de sa mobilité électrophorétique dans le gel. Dans un gel soumis à un gradient de température (TTGE) ou incluant un gradient d'agent dénaturant (DGGE), l'ADN se concentre en une position déterminée par la séquence du fragment amplifié. L'avantage de ces méthodes est leur applicabilité à un consortium microbien : les micro-organismes sont caractérisés par une bande spécifique identifiable dans le profil généré par l'ensemble. Avec les régions variables de l'ADNr 16S comme cibles d'amplification génique, les méthodes TTGE et DGGE se sont révélées performantes pour identifier les bactéries lactiques de divers produits laitiers - fromages, laits fermentés et kéfirs - au niveau taxonomique de l'espèce (**Theunissen *et al.*, 2005**).

- ***Hybridation spécifique***

D'autres méthodes reposent sur l'hybridation d'une courte séquence nucléotidique de synthèse, spécifique au taxon à identifier ou à détecter, avec la séquence complémentaire de l'ADN de la souche à identifier. Le succès de l'hybridation est révélé par un marqueur lié à la séquence de synthèse, alors appelée sonde, ou par la technique de PCR. Dans ce deuxième cas, deux amorces (séquences nucléotidiques de synthèse) sont nécessaires ; seule une des deux amorces doit être spécifique au taxon ciblé. Des sondes et des amorces spécifiques à certaines bactéries lactiques ont été décrites et répertoriées respectivement par (**Coeuret *et al.*, 2003**) et par (**Temmerman *et al.*, 2004**).

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

1. Echantillonnage

Au cours de l'année 2012, dix échantillons de lait cru de chamelle provenant de la région de BECHAR, KHEITTER, EL BAYED, ont été prélevés en conditions stériles dans des flacons à 250ml, contenant chacun 150ml de lait. Ces derniers ont été transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire pour analyse microbiologique.

2. Isolement des souches lactiques

Des tubes contenant 10ml de lait ont été incubés à 30°C pendant 48h afin de favoriser la croissance de la flore lactique. Après fermentation, des dilutions décimales (10^{-5} à 10^{-7}) ont été effectuées et 1ml a été ensemencé sur milieux M17 et MSE pour l'isolement de *Lactococcus* et de *Leuconostoc* respectivement. Les boîtes de pétries ont été incubées à 30°C en conditions aérobie pendant 24h à 48h (Badis *et al.*, 2004). L'isolement sélectif des bactéries lactiques par culture sur plusieurs milieux a été réalisé selon le **tableau 5**.

Tableau 5: milieux utilisés et conditions d'isolement des bactéries lactiques

Microorganismes	Milieu d'isolement	T°C	Durée (h)	Incubation
<i>Lactococcus</i>	M17	30	48	Aérobiose
<i>Leuconostoc</i>	MSE	30	48	Aérobiose
<i>Weissella</i>	MSE	30	48	Aérobiose

3. Purification

Les colonies isolées ont été purifiées par la méthode des stries sur le même milieu, la pureté de la culture a été vérifiée par observation microscopique. Les isolats purs à Gram positif et catalase négative, non sporulés seront retenus.

4. Identification des isolats

L'identification microbiologique des isolats purs passe en premier lieu par l'identification du genre ensuite des tests supplémentaires permettent l'identification de l'espèce.

La détermination du genre est basée sur les caractéristiques morphologiques (forme cellulaire, mode d'association), le type respiratoire, le type fermentaire (homofermentaire,

hétérofermentaire), résistances à la salinité (2% NaCl, 4% NaCl, 6.5% NaCl), croissance à pH 9.6 et à différentes températures 30 et 45°C (**Badis *et al.*, 2005**).

4.1. Caractéristiques morphologiques

L'observation microscopique des cultures jeunes permet de déterminer la forme cellulaire ainsi que le mode d'association.

4.2. Type fermentaire

Des tubes à essais contenant le bouillon MRS avec cloche de Durham sont ensemencés par les différentes souches purs et incubés à 30°C pendant 48h, la production de gaz se manifeste par la montée de la cloche et l'apparition de bulles d'air.

4.3. Résistance à la salinité

La croissance des isolats purs en présence de différentes concentrations de NaCl, à savoir (2% NaCl, 4% NaCl, 6.5% NaCl) est utilisé principalement pour différencier le genre *Enterococcus* des autres genres de bactéries lactiques.

4.4. Croissance à pH basique

Vérifier l'aptitude des souches à croître à pH 9,6 sur bouillon MRS.

4.5. Croissance à différentes températures

Les souches pures sont ensemencées sur bouillon MRS et incubées à différentes températures, 30°C et 45°C pendant 3 jours, la croissance à 45°C révèle des bactéries thermophiles (**Drici., *et al* 2009**)

4.6. Hydrolyse de l'arginine

La recherche de l'enzyme arginine déshydrolase (ADH) est faite sur le milieu M16 BCP. Ce milieu contient du lactose (2 mg / ml) et de l'arginine (4 mg / ml) et un indicateur de pH le pourpre de bromocrésol (0,05 mg / ml). La croissance des bactéries lactiques sur ce milieu permet de révéler la fermentation du lactose, et la production d'acide lactique provoque le virage de l'indicateur de pH au jaune. En revanche les bactéries lactiques possédant une ADH vont métaboliser l'arginine et libérer ainsi le NH₄ qui va neutraliser l'acide lactique, cette neutralisation empêche le virage de l'indicateur de pH gardant ainsi la couleur initiale du milieu (**Thomas, 1973**).

En plus des caractères morphologiques effectués précédemment, d'autres caractères sont utilisés pour la confirmation du genre et l'identification de l'espèce.

4.7. Production de dextrane

Le milieu MSE est utilisé pour la détection des espèces de bactéries lactiques capable de produire du dextrane (cette substance d'intérêt technologique et pharmaceutique joue un rôle très important en industrie agroalimentaire), sur ce milieu les bactéries lactiques productrices de dextrane donnent des colonies larges et visqueuses.

L'addition de vancomycine permettra la sélection des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* (Mayeux *et al.*, 1962).

4.8. La production d'acétoïne

La production d'acétoïne est détectée par la réaction de Voges Proskauer sur le bouillon lactosé et citaté. La mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est obtenue après une culture de 72 h à 30°C. 1 mL de culture est additionné de 0,5 mL de réactif α naphthol et 0.5 mL de NaOH à 16%. Après 10 min une coloration rose en surface indique la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude et se combine avec l' α naphthol en complexe rouge.

4.8. Utilisation du citrate

Mis en évidence sur milieu **Kempler et Mc Kay (1980)**, contenant une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide. Après 48h d'incubation, les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches et celle qui le fermentent donnent une coloration bleu.

4.9. Fermentation des sucres

Les souches bactériennes cultivées sur milieu gélosé ont subies deux lavages dans de l'eau physiologique stérile, le culot bactérien est récupéré et mélangé au bouillon MRS dépourvu de sucre et d'extrait de viande, les sucres testés sont les suivants :

Glucose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose, Tréhalose, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Xylose, Sacharose.

5. Caractérisation des aptitudes technologiques

5.1 Cinétique de croissance et d'acidification

Du lait écrémé, reconstitué (100 g.l⁻¹) additionné de 0.3% d'extrait de levure est utilisé comme milieu de culture pour la mesure de l'activité acidifiante. Chaque souche estensemencée dans des tubes stériles contenant chacun 10 ml de lait écrémé stérile Les pré-cultures sont incubées à 37°C jusqu'à coagulation. 3% de la pré-culture est transvasée stérilement dans 250 ml de lait écrémé. Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube La mesure d'acidité, produite par les souches 12L, 5Me, AMa, S est réalisée par pH mètre et par titrimétrie. Les cinétiques de croissance et d'acidification sont réalisées simultanément aux intervalles de temps, 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 48h et 72h. (Boumehira *et al.*, 2011).

5.2 Dosage de l'acidité

A chaque intervalle de temps, 10 ml de la culture est transféré dans un bécher à 50 ml, l'évaluation de l'acidité produite par les souches est réalisée par pH mètre, la mesure de l'acidité dornic est réalisée par titrimétrie : 5 gouttes d'une solution de phénophtaléine (2%) sont ajoutées. La neutralisation de l'acidité est réalisée par addition d'une solution NaOH 1/9N sous agitation jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante, On note alors le volume de la soude utilisée.

Les résultats sont exprimés en degré Dornic selon la formule.

$$\text{Acidité} = n \times 10$$

Avec **n**: volume de la solution sodique utilisée pour titrer 10 ml de lait.

1° D= 0,1 g/l d'acide lactique produit.

5.3 Dénombrement bactérien

La concentration bactérienne est déterminée sur milieu MRS gélosé après ensemencement en masse. Les boîtes sont incubées sous atmosphère aérobie à 30 °C pendant 48 h. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par unité de volume (UFC.mL⁻¹) et correspondent à la moyenne géométrique de trois comptages.

5.4 Détermination des paramètres de la croissance

Les paramètres de croissance sont déterminés au niveau de la phase exponentielle, on calcule alors le taux spécifique de croissance (μ), ainsi que le temps de génération (G).

- ***Le taux de croissance (μ)***

C'est la vitesse de croissance des bactéries par heure, graphiquement

$$\mu = (\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1) / (t_2 - t_1) \log_{10} 2$$

- ***Le temps de génération***

C'est le temps nécessaire au doublement de la population en minutes ou en heures.

$$G = \frac{t}{n}$$

Où n est le nombre de génération

Graphiquement, on choisit une valeur de $\log_{10} N$ pendant la phase exponentielle et un $\log_{10} N$ du double de ce N. On reporte les deux valeurs sur l'axe des abscisses et on lit directement la valeur de G. Par le calcul, $\mu = 1 / G$.

6. Le profil protéique

L'électrophorèse protéique est une technique puissante de caractérisation appliquée à la systématique microbienne. Le profil protéique constitue l'empreinte digitale d'une espèce (**Vandamme *et al.*, 1996**). Il donne, surtout une information sur l'analogie des souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous espèces, il permet même, souvent de reconnaître des souches individuelles dans la même espèce. Le classement obtenu par l'électrophorèse protéique se retrouve semblable à celui établi par la technique d'hybridation ADN/ADN.

6.1. Extraction des protéines totales

Les bactéries lactiques sont incubées sur bouillon MRS pendant 18h, le culot est récupéré par centrifugation à 4600 rpm pendant 10min, les cellules sont lavées deux fois dans de l'eau distillée est centrifugées à 4600 rpm /15min/ 4°C, la lyse cellulaire est effectuée dans 100µl de solution de lyse (1 ml de tampon Tris 25mM contenant 25mg de lysozyme, suivi d'une incubation à 37°C pendant 30min. A ce mélange rajouter 0,9ml de tampon phosphate 0,1M (pH 6,8) contenant 5% β mercaptoéthanol, 5% sucrose et 0,1ml SDS (20%), les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 2min puis centrifugés à 4600 rpm/ 30min/ 4°C, récupérer le surnageant est le conserver à -20°C, la **figure 8** récapitule le procédé d'extraction des protéines totale des bactéries lactiques.

6.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976)

La concentration en protéines solubles est mesurée par spectrophotométrie à 595 nm, en présence de bleu de Coomassie (réactif de Bradford). 100µl d'échantillons sont rajouté à 1mL de réactif de Bradford. Ils sont ensuite incubés 10 min à l'obscurité à température ambiante, et l'absorbance est lue à 595 nm contre un témoin approprié. Une gamme de SBA est utilisée comme standard.

- **Gel de séparation : voir annexe II**

Acrylamide 30%, Bis-acrylamide (1%) à : T=15%, SDS 0.01% (p/v), 27% Tris-HCl 3 M, pH 8.8 et H₂O (14%). La réaction de polymérisation est catalysée par 100 µL (pour 10ml du volume totale) d'une solution de persulfate d'ammonium à 10% et 50 µL de TEMED (tetraméthyl éthylène diamine).

- **Gel de concentration : voir annexe II**

Acrylamide 30%, Bis-acrylamide (1%) à : T=5%, SDS 0,01% (p/v), Tris-HCl 1,2 M, pH 6,8 et H₂O (30,80%). La polymérisation est catalysée par 100 µL (pour un volume total de 15 ml) d'une solution de persulfate d'ammonium à 10% et 50 µL de TEMED.

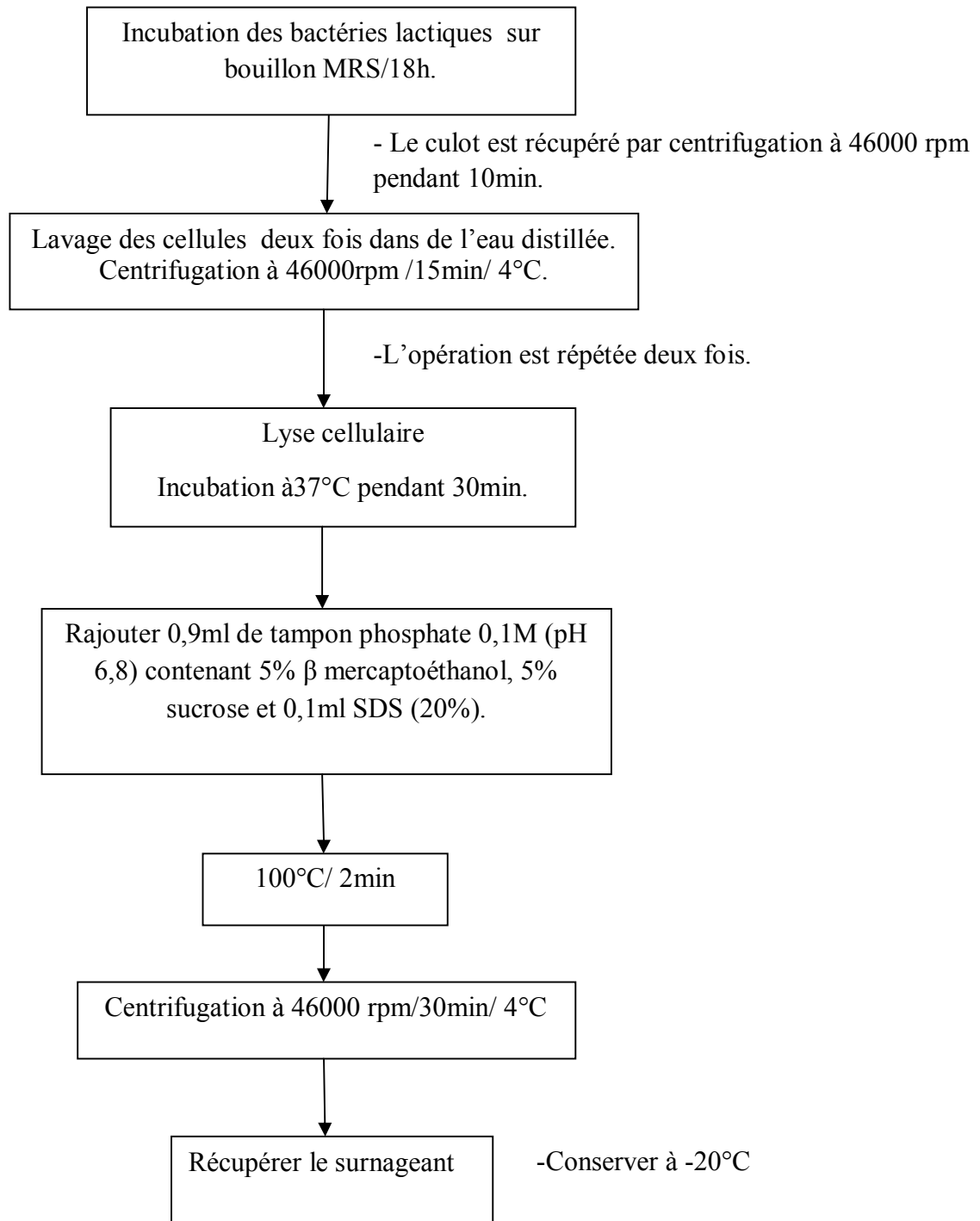


Figure 8 : Schéma général du procédé d'extraction des protéines totale des bactéries lactiques.

7. Préparation de l'appareillage et du support :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) est réalisée sur un appareil où le gel est en position verticale (**Fig. 9**)

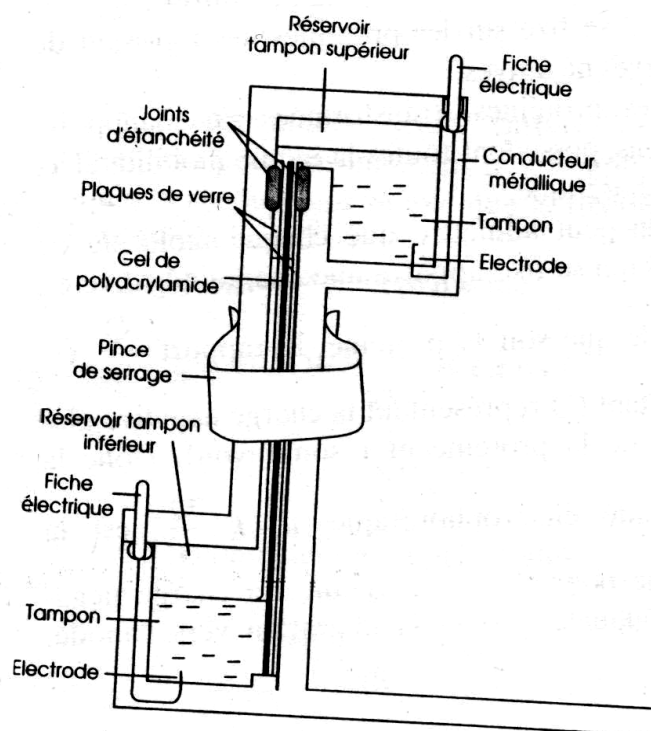


Figure 9 : vue en coupe d'une cuve d'électrophorèse verticale pour gel de polyacrylamide (Ghazi *et al.*, 2006)

Les plaques de verre bien nettoyées sont assemblées sur l'appareil. La solution du gel inférieur ou gel résolutif à 15 % préparée extemporanément est coulée entre ces deux plaques. Après polymérisation, à température ambiante, le gel supérieur ou de concentration à 5 % (**Annexe II**) préparé est immédiatement coulé entre les plaques de verre au-dessus du gel résolutif. Le peigne qui permet la formation des puits est placé dans la solution, il faut faire attention à ce qu'il ne reste plus de bulles d'air sous les dents du peigne. Après polymérisation du gel de concentration (à température ambiante), on enlève le peigne. Les cuves sont remplies de tampon de migration (**Annexe II**).

8. Dépôt des échantillons :

75µl de protéines sont solubilisées dans 25 µl de tampon de charge Tris à 0,24 M, glycérol 20% (v/v), SDS 8% (p/v), bleu de Bromophénol 0,2 % (p/v) et 2-β mercaptoéthanol 10 % (v/v), puis traitées à 100°C pendant 10 min. Les échantillons sont déposés dans les puits à l'aide d'une seringue Hamilton

9. Migration différentielle des protéines :

Les protéines dénaturées sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 15% dans un tampon de migration Tris-glycine (Tris 25mM, glycine 192mM, SDS 0,1% pds/vol, pH 8,3). Une fois les puits remplis, le courant est branché, La séparation est réalisée sous une tension constante fixée à 150V pendant 120min. Les protéines chargées négativement migrent de haut en bas (du – au +) et le courant est arrêté quand le front du bleu de bromophénol (du tampon d'échantillon) parcourant le gel arrive en bas.

10. Révélation des protéines :

Une fois la migration des protéines achevée, le gel est immédiatement immergé dans une solution coloration des protéines à 0,15 % de bleu de Coomassie. La décoloration est obtenue par plusieurs bains dans une solution de décoloration (**Annexe II**).

11. Analyse de l'électrophorégramme :

La masse moléculaire M d'une protéine migrant dans le gel avec un déplacement d est déterminée grâce à une courbe étalon du logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique.

$(\text{Log } M) = f(d)$ obtenue à l'aide des protéines marqueurs.

L'analyse des résultats repose sur la comparaison des ressemblances et disparités dans les profils protéiques des espèces étudiées.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

1. Identification des espèces

Les bactéries isolées à Gram positif et catalase négative ont été purifiées par repiquage sur milieu solide et liquide (**Fig. 10**) alternativement, la pureté des souches été vérifiée par observation microscopique après coloration de Gram, les colonies été petites, convexe et lisses ; certaines été blanchâtres d'autres grisâtres (**Fig. 11**).

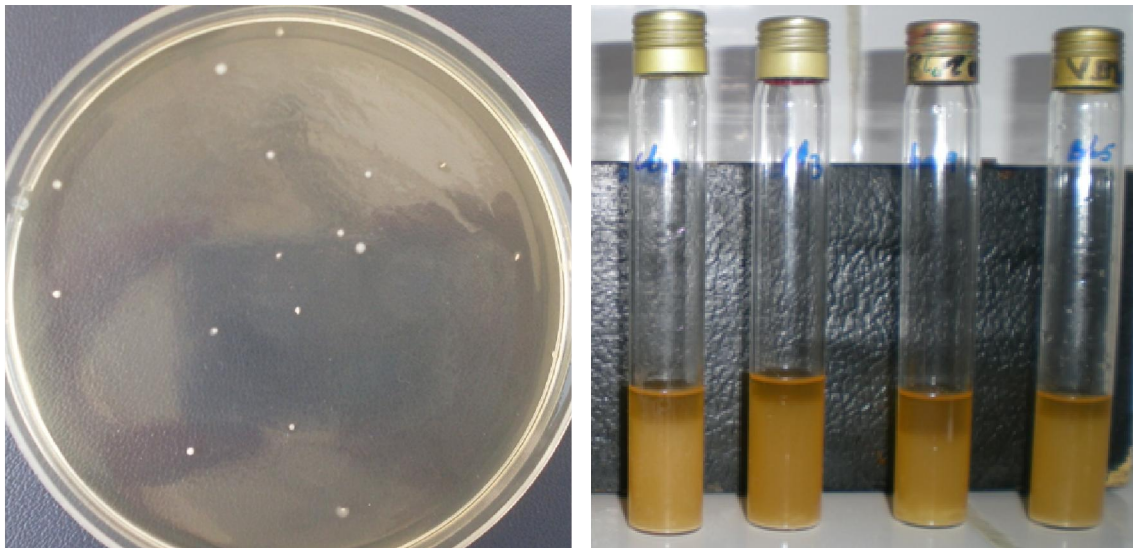


Figure 10 :colonies blachatre sur milieu MRS solide pH 6,8 à gauche, et culture sur bouillon MRS à droite.

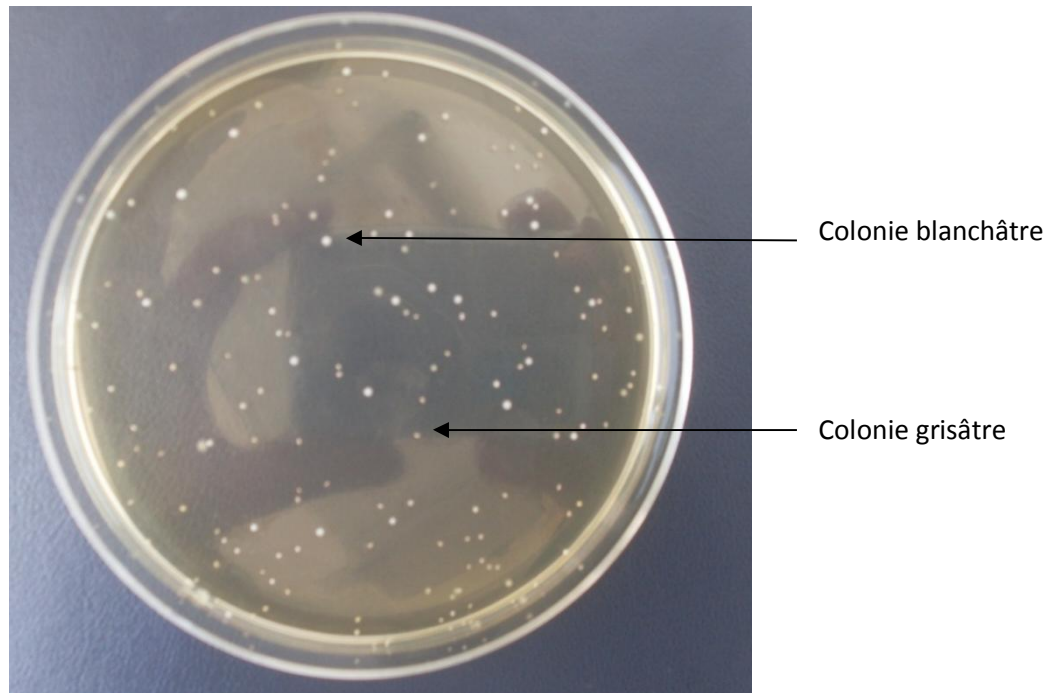


Figure 11 : colonies de bactéries lactiques blanchâtres et d'autre grisâtre sur milieu M17.

Au cours de cette étude nous avons isolé 31 souches sous forme de coque possédant les caractères des bactéries lactiques, elles sont toutes Gram⁺, catalase négative et non sporulées.

- Les homofermentaires représentent 71% des isolats:
 - 22,58% résistants à 6,5% de NaCl et poussent à pH=9,6.
 - 32,25% ont une croissance négative à 6,5%NaCl et à p=9,6 et poussent à 10°C et 30°C, 42,85% d'entre eux sont acetoine⁺ et 14,28% sont acetoine⁻.
 - 9,67% poussent à 10°C, 45°C mais leurs croissance est négative à 6,5% NaCl, toute les souches sont acetoine⁺.
- Les hétérofermentaires (**Fig .12**) représentent 29% des isolats :
 - 19,35% sont ADH⁻ dont 83,33% produisent du dextrane
 - 9,6% sont ADH⁺ dont 100% produisent du dextrane

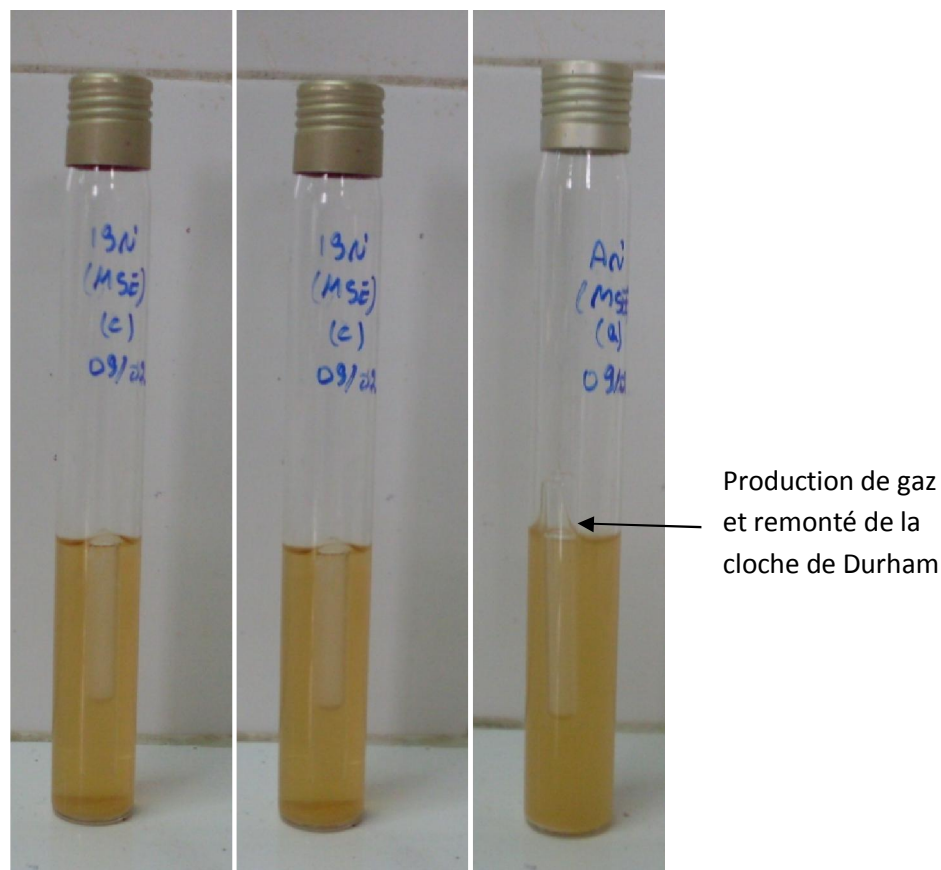


Figure 12 : production de gaz à partir de glucose sur milieu MRS sans extrait de viande.

1.2 Caractéristiques du genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en diplo ou en chainettes, à Gram-positif, anaérobies mais aérotolestants, homofermentaires et ne possédant ni catalase ni arginine dihydrolase, leur culture à pH 9,6 est négative.

1.3 Caractérisation du genre *Leuconostoc*

Les leuconostoc se présentent sous forme de coques ovoïdes en diplo ou en chainettes, à Gram-positif, anaérobies mais aérotolestants, hétérofermentaires, ne possédant pas de catalase et possédant une arginine dihydrolase (**Fig. 13**), les espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* sont productrices de dextrane, cette substance visqueuse est mise en évidence sur milieu hypersacharosé (MSE) (**Fig. 14**).

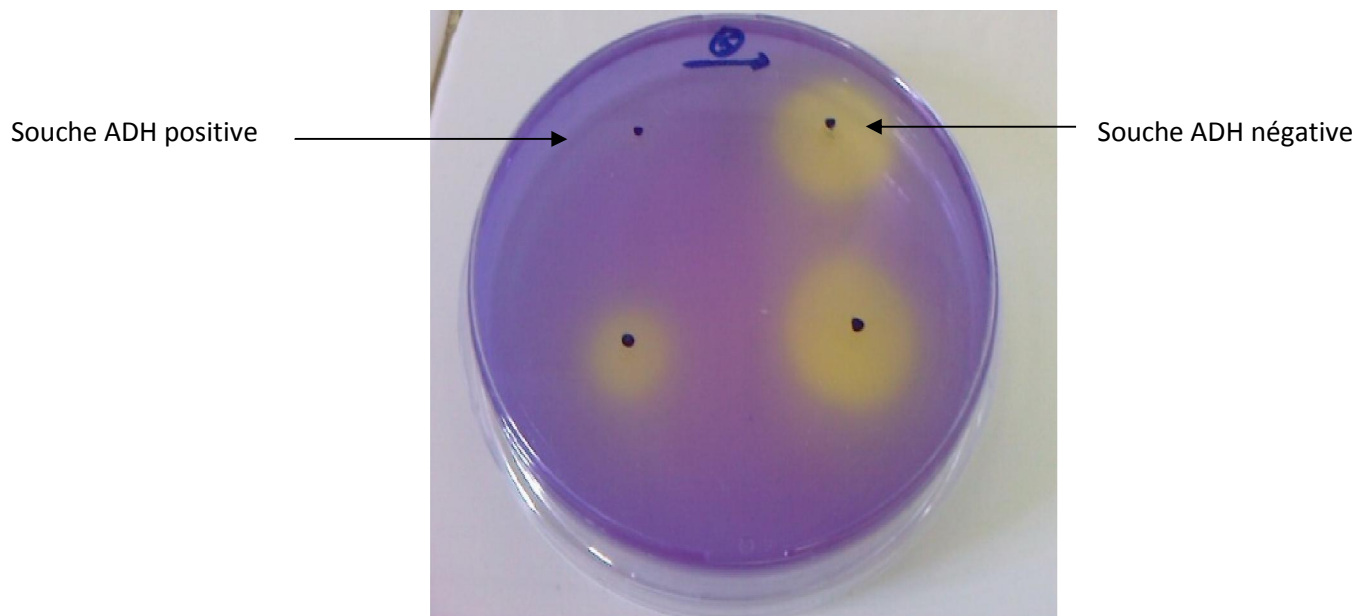


Figure 13 : recherches d'ADH chez les bactéries lactiques sur milieu M16BCP.

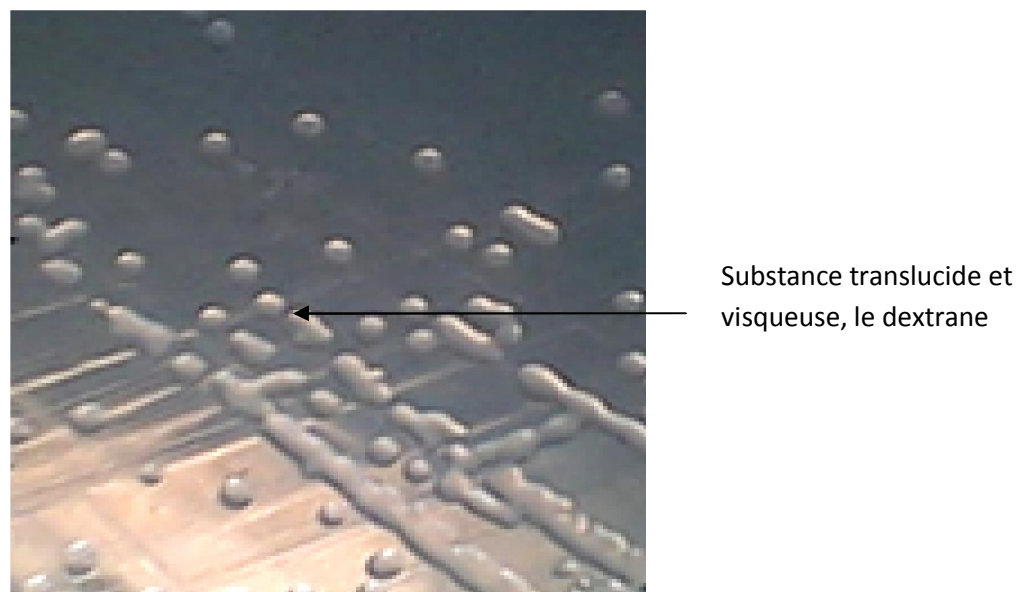


Figure 14 : production de dextrane sur milieu MSE par la souche H (*Leuconostoc*).

1.4 Caractérisation du genre *Weissella*

Les espèces appartenant au genre *Weissella* se présentent sous forme de coques ou de bacilles à Gram-positif, anaérobies mais aérotolérants, hétérofermentaires, ne possédant pas de catalase, la présence de l'arginine dihydrolase est variable selon les espèces.

2. Identification des isolats au niveau du genre

La détermination du genre est basée sur les caractéristiques morphologiques (forme cellulaire, mode d'association) (**Fig. 15**), le type fermentaire (homofermentaire, hétérofermentaire), résistances à la salinité (2% NaCl, 4% NaCl, 6.5% NaCl), croissance à pH 9.6 et à différentes températures 10 et 45°C. Le **tableau 6** résume les caractéristiques biochimiques et physiologiques des isolats.

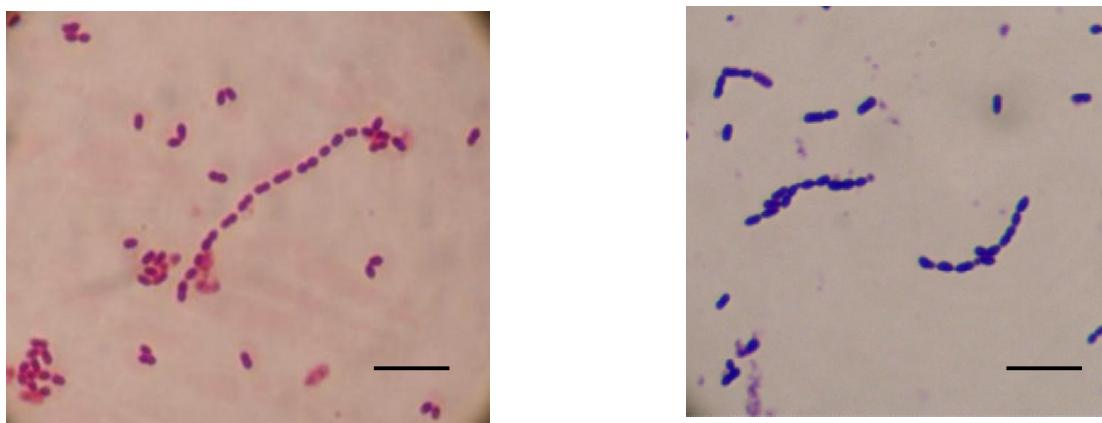


Figure 15 : observation microscopique de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) à gauche et *Leuconostoc* sp (W₁) à droite isolée du lait cru de chamelle sous forme de coque ovoïde en diplo et en chainettes (barre 1µm).

Tableau 6 : caractéristiques physiologiques des souches isolées de lait de chamelle.

CARACTERES	SOUCHES														
	19Ma Wei	19Mb Wei	19Mc Wei	19a ₂ Lc	19c ₁ Lc	16Ma Lc	16Mb En	16Mc Lc	16a ₂ Lc	16c ₂ Lc	12Ma En	12Mb En	12Mc En	12Md En	12Me En
Croissance à 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4% NaCl	–	–	–	–		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 6.5% NaCl	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+
Croissance à 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45°C	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+
Croissance à PH9.6	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+
Production de dextrane	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hydrolyse de l'arginine	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+											
acétoïne		+	+				–				–	–	–	–	–
gaz à partir du glucose	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

+ : réaction positive, – : réaction négative, *Ln* : *Leuconostoc sp*, *Lc* : *Lactococcus sp*, *Wei* : *Weissella sp*, *En* : *Enterococcus sp*.

Suite du tableau

CARACTERES	SOUCHES															
	AMa <i>Ln</i>	AMc <i>Ln</i>	5Ma <i>Lc</i>	5Mb <i>En</i>	5Mc <i>Lc</i>	5Md <i>En</i>	5Me <i>Lc</i>	5a <i>Lc</i>	5c <i>Lc</i>	6Ma <i>Lc</i>	6Mc <i>Lc</i>	12L <i>Lc</i>	S <i>Ln</i>	H <i>Ln</i>	W ₁ <i>Ln</i>	W ₃ <i>Ln</i>
Croissance à 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4% NaCl	–	–	+	+		+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Croissance à 6.5% NaCl	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Croissance à 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45°C	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Croissance à PH9.6	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Production de dextrane	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	–	–	+	+	+	+	+			+		+	–	–	–	–
citrate	+	+	–	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+
acétoïne	–	–	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–
gaz à partir du glucose	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

+ : réaction positive, – : réaction négative, *Ln* : *Leuconostoc sp*, *Lc* : *Lactococcus sp*, *Wei* : *Weissella sp*, *En* : *Enterococcus sp*.

3. Identification au niveau de l'espèce

Parmi nos isolats nous avons choisie 2 espèces appartenant au genre *Lactococcus* (12L, 5ME) et deux espèces appartenant au genre *Leuconostoc* (S, AMa). Les caractéristiques physiologiques et biochimiques sont illustrées au **tableau 7**.

Tableau 7:caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*.

CARACTERES	12L <i>Lactococcus. lactis subsp. lactis biovar. Diacetylactis</i>	5Me <i>Lactococcus. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>	AMa <i>Leuconostoc. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	S <i>Leuconostoc. mesenteroides subsp cremoris</i>
Croissance à 2% NaCl	+	+	+	+
Croissance à 4% NaCl	+	+	—	—
Croissance à 6.5% NaCl	—	—	—	—
Croissance à 30°C	+	+	+	+
Croissance à 45°C	+	+	+	+
Croissance à PH9.2	—	+	—	—
Production de dextrane	—	—	+	—
Hydrolyse de l'arginine	+	+	—	—
citrate	+	+	+	+
acétoïne	+	+	—	+
gaz à partir du glucose	—	—	+	+

Suite du tableau 7

	SOUCHES			
	12L <i>Lactococcus. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>	5Me <i>Lactococcus. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>	AMa <i>Leuconostoc. mesenteroides subsp mesenteroides</i>	S <i>Leuconostoc . mesenteroides subsp cremoris</i>
Fermentation des sucres				
Glucose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	—
Mannose	+	+	+	—
Maltose	+	+	+	—
Lactose	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	—
Mannitol	+	+	+	—
Melibiose	+	+	+	—
Raffinose	+	+	+	—
Xylose	+	+	+	—
Sacharose	+	+	+	—

4. Caractérisation moléculaire

L'électrophorèse des protéines totales des souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* isolées du lait cru de chamelle a été réalisée dans un gel de 15% polyacrylamide. Les bandes de protéines étaient révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

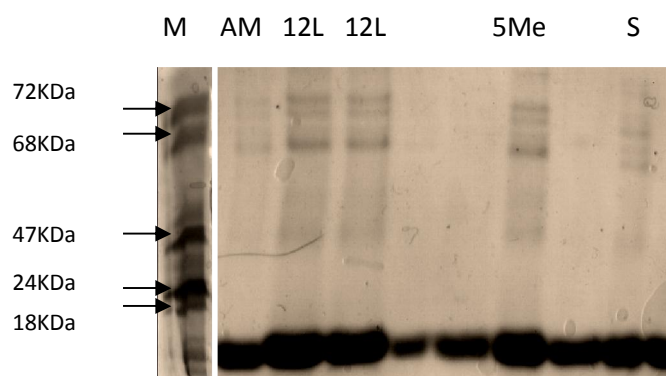


Figure 16a : Profile des protéines totales par SDS-PAGE, M : standard (Lactoférine : 72Kda, SBA : 68Kda, Ovalbumine : 47Kda, Caséine : 24Kda, β lactoglobuline : 18Kda), ligne 1: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa), ligne 2 : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (12L), ligne 3 : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (5Me), ligne 4 : *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (S).

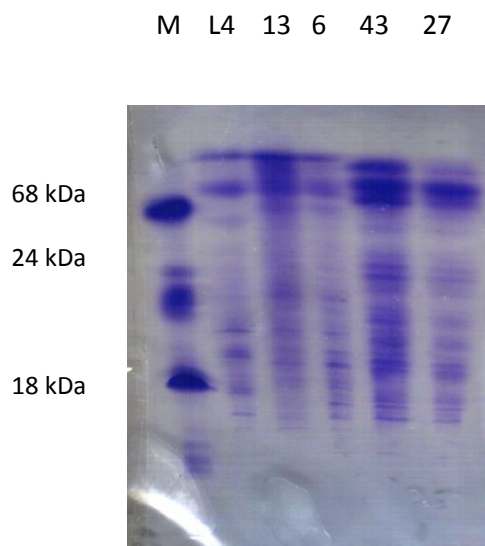


Figure 16b : Le profil protéique total des souches de *Leuconostoc* (L4, 43, 27) et *Weissella paramesenteroides* (13, 6) isolées à partir du lait cru de chèvre (GHAZI et al 2006).

Les résultats des profils des protéines totales montrent une différence dans le nombre de bandes protéiques entre les deux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Ces profils fournissent, les premiers résultats concernant les fractions cellulaires des souches lactiques isolées du lait cru de chamelle.

L'empreinte du profil de protéines bactérienne SDS-PAGE a été employée, afin de préciser la caractérisation phénotypique de nos souches, et améliorer l'identification. L'analyse d'extraits protéiques de 4 souches représentatives a été étudiée. Elle a été réalisée par comparaison visuelle des profils électrophorétiques (Fig. 16a, Fig. 16b). Les résultats de Ghazi et collaborateurs 2006, ont confirmé l'identification phénotypique des souches de *leuconostocs* isolées du lait cru de chèvre.

Sanchez *et al.* (2003) ont observé que la technique SDS-PAGE a généré des modèles complexes et stables qui étaient faciles à interpréter et à comparer avec des souches de référence de bactéries lactiques.

Les résultats obtenus par SDS-PAGE des protéines de cellules entières sont autant efficace que l'hybridation ADN-ADN (**Ferraz *et al.*, 2000**)

5. Etude cinétique

La caractérisation de souches lactiques d'intérêt technologique passe obligatoirement par l'étude de leur vitesse de croissance sur milieu lait. Quatre isolats ont été retenus pour cette étude, deux souches homofermentaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et deux souches hétérofermentaire *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ont été suivies.

Les paramètres technologiques, cinétique de croissance, cinétique d'acidification et cinétique du développement du pH ont été réalisés sur les quatre souches. Les paramètres spécifiques de chaque souche ont été calculés à partir des courbes établies. Parmi ces paramètres, la vitesse spécifique de croissance (μ), le temps de génération (G), taux maximale de croissance, vitesse maximale d'acidification V_{max} , pH initial et pH final ainsi que le taux d'acide final.

5.1 Détermination de la courbe de croissance bactérienne

D'après **De Roissart (1986)**, le taux de croissance (μ) se définit comme la vitesse spécifique de croissance (en h^{-1}), c'est à dire la vitesse de croissance (dx/dt) rapportée à l'unité de biomasse (X).

Il existe également une relation simple entre le taux de croissance (μ) et le temps de génération (g), qui peut être définie comme suit : $\mu = 1/g$.

- **Cinétique de croissance des souches de *Lactococcus***

Parmi les lactocoques isolés nous avons choisi l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* représenté par les souches 12L et 5Me, ces isolats ont la particularité de pousser à des températures thermophiles (45°C), pour cela nous avons suivi la croissance microbienne de chaque souche (**Fig. 17**), l'évolution de l'acidité dornic (**Fig. 18**) ainsi que l'évolution du pH à des intervalles de temps entre 0h et 72h (**fig. 19**). Les vitesses d'acidification de chaque souche sont estimées par le dressage des droites de régression linéaire de chaque courbe en utilisant Microsoft Office Excel 2007.

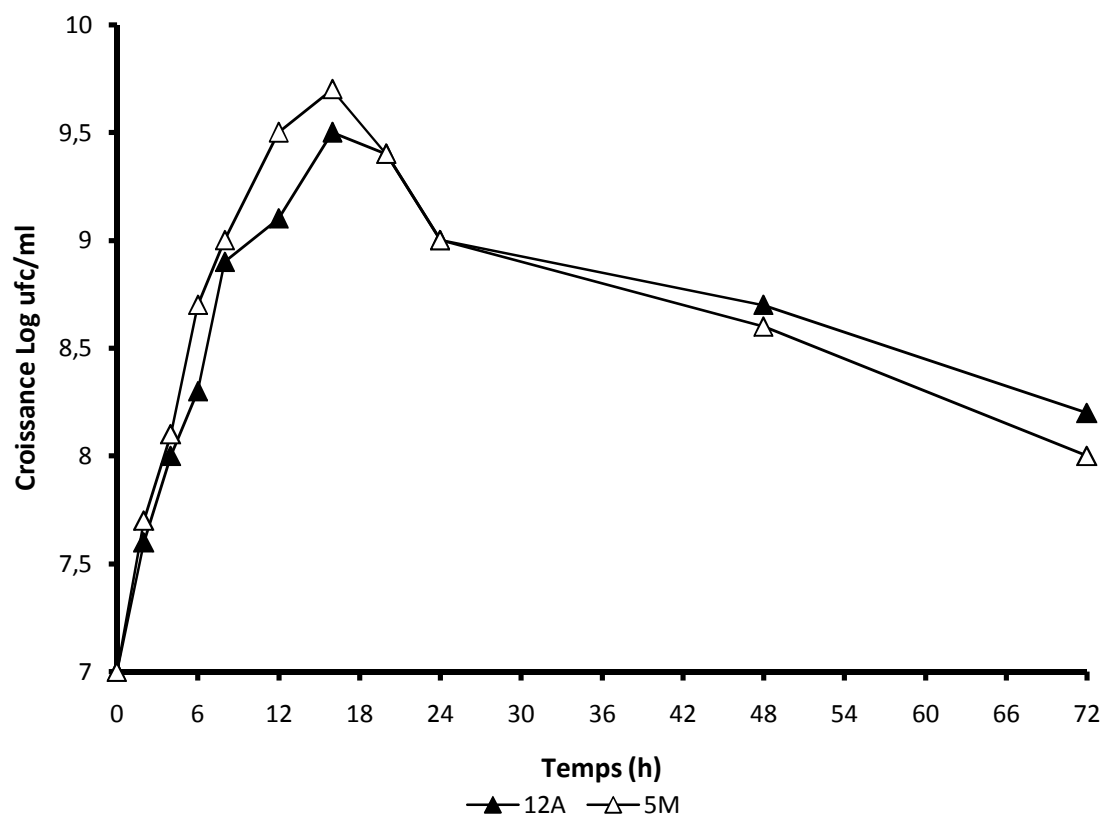


Figure 17 : Evolution de la croissance en fonction du temps de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) et *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

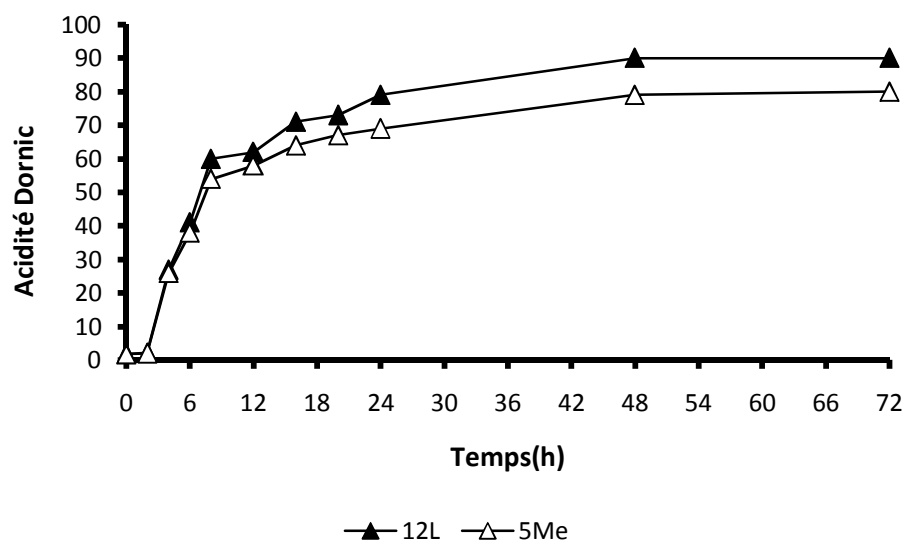


Figure 18 : Evolution de l'acidité dornic en fonction du temps des souches *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) et *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé incubé à 37°C.

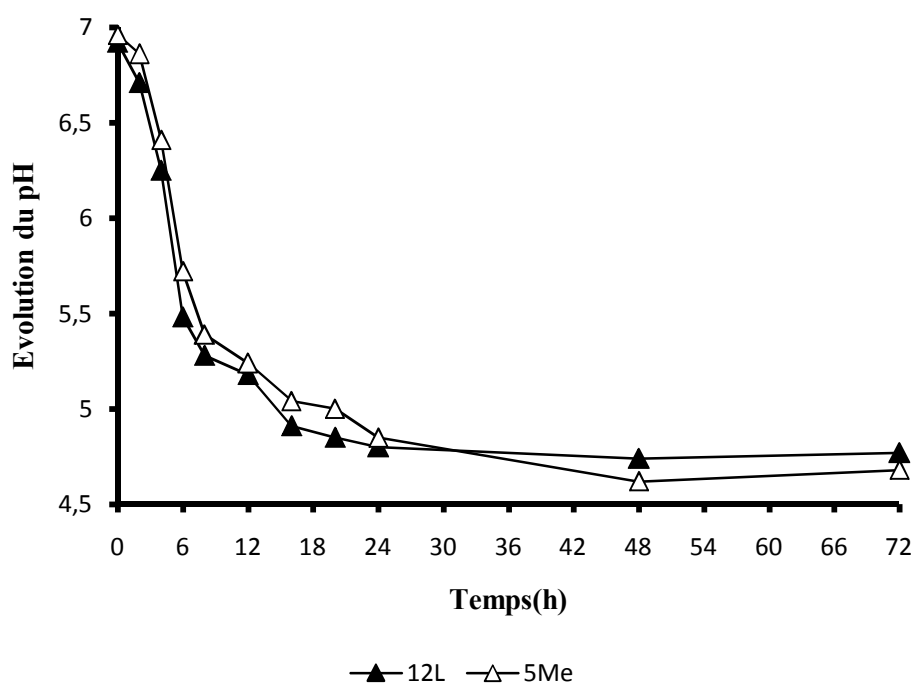


Figure 19 : Evolution du pH en fonction du temps des souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L), *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (5me) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

Interprétation

L'évolution de la concentration en biomasse des souches (12L) et (5Me) en lait écrémé est divisée en trois phases. La phase de croissance exponentielle dure 16 heures au cours de laquelle la production de biomasse atteint 9,7Log ufc/ml et 9,5Log ufc/ml respectivement. La cinétique d'apparition des produits de fermentation suit celle de la croissance, avec 78mM d'acide lactique produit par la souche (12L) et 71mM pour la souche (5Me).

L'acidification du lait a lieu au cours de cette phase avec une baisse de pH de 1,96 unité pour la souche (12 L) et 2,09 unités pour la souche (5Me). La phase de croissance précède une phase de ralentissement entre 16h et 24h, au cours de laquelle 8,89 mM de lactate supplémentaire sont produits par (12L) entraînant une baisse de 0,19 unités pH et 5,55 mM par (5Me) avec une baisse de 0,11 unités de pH. Au cours de cette phase, la croissance est ralentie alors que la glycolyse et l'acidification sont maintenues, avec cependant des vitesses bien inférieures à celles de la phase de croissance.

Pendant la phase de déclin, entre 24h et 72h, la croissance est très faible, elle atteint des valeurs minimales de 8,2Log ufc/ml et 8Log ufc/ml pour les souches (12L) et (5Me), la production de lactate est très faible, elle est de 13mM pour (12L) et de 4mM pour (5Me) ce qui ne varie le pH que très faiblement, il est de l'ordre de 4,68 pour (5Me) et 4,77 pour (12L).

Le lait écrémé permet une croissance légèrement différente des deux souches, avec un taux de croissance de $0,49h^{-1}$ et un temps de génération de 120 min pour la souche (12L) et un taux de croissance de $0,55h^{-1}$ et un temps de génération de 113 min pour la souche (5Me). La vitesse maximale d'acidification est de $2 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$, équivalente aux deux souches. Le **tableau8** récapitule les différents paramètres de la cinétique de croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (12L) et (5Me).

Tableau 8 : Les paramètres relatifs à la croissance de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar. *diacetylactis* (12L, 5Me) sur milieu lait écrémé à 37°C.

Phases	parametre	12L	5Me
Croissance	pH _i	7	7
	μ	0.49 h ⁻¹	0.55 h ⁻¹
	G	120 min	113 min
	V _{max}	2.10 ⁻³ upH. min ⁻¹	2.10 ⁻³ upH. min ⁻¹
	production d'acide	78 mM	71 mM
ralentissement	Temps	16h-24h	16h-24h
	Abaissement de pH	0,19 upH	0,11upH
	Production d'acide	8,89 mM	5,55 mM
Déclin	Temps	24h-72h	24h-72h
	Biomasse finale	8,2 Logufc/ml	8 Logufc/ml
	pH _f	4,68	4,77

pH_i : pH initiale, μ : taux de croissance (h⁻¹), G/temps de génération (min), V_{max} : vitesse d'acidification maximale, pH_f : pH finale.

- **Cinétique de croissance des souches de *Leuconostoc***

Parmis les leuconostoc nous avons choisi les espèces de *Leuconostoc.mesenteroides* subsp.*mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc.mesenteroides* subsp.*cremoris* (S) ayant la capacité de pousser à 45°C, nous avons suivi la croissance microbienne (**Fig. 20**), l'évolution de l'acidité dornic (**Fig. 21**) ainsi que l'évolution du pH (**Fig. 22**) à des intervalles de temps entre 0h et 72h.

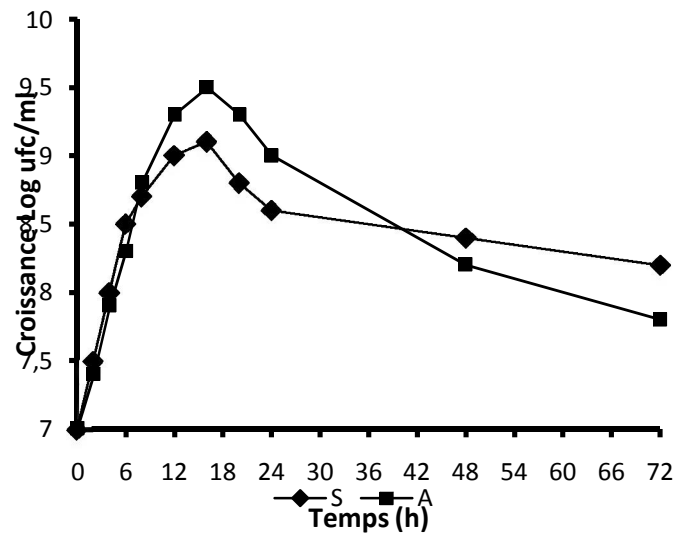


Figure 20 : évolution de la croissance en fonction du temps de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (A) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

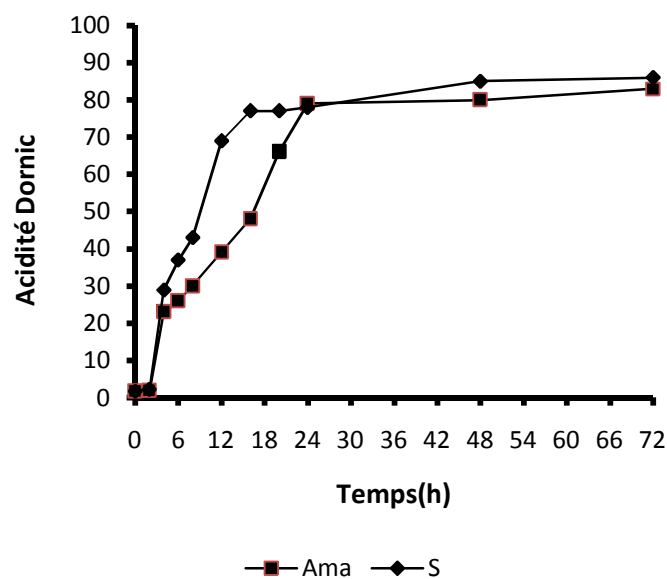


Figure 21: Evolution de l'acidité dornic en fonction du temps des souches *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (A) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

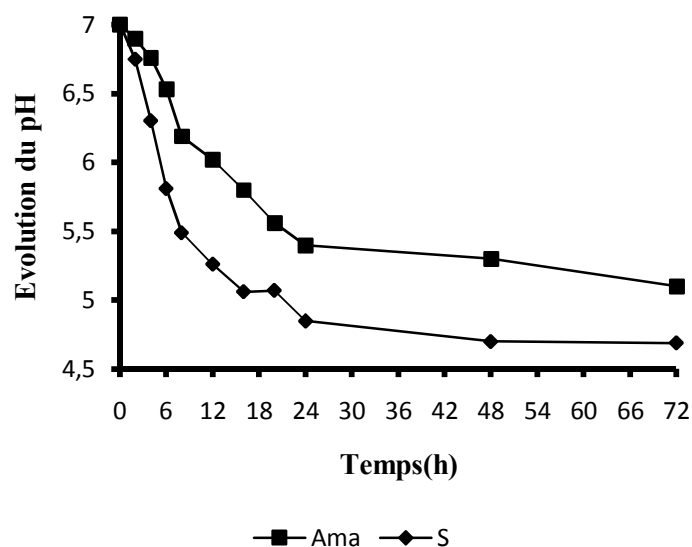


Figure 22 : Evolution du pH en fonction du temps des souches *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (S) au cours de culture en milieu lait écrémé à 37°C.

Interprétation

L'évolution de la concentration en biomasse des souches (AMa) et (S) en lait écrémé est divisée en trois phases. La phase de croissance exponentielle dure 16 heures au cours de laquelle la production de biomasse atteint 9,5Log10 ufc/ml et 9,1Log ufc/ml respectivement. La cinétique d'apparition des produits de fermentation diffère entre les deux souches, avec 87,77mM d'acide lactique produit par la souche (AMa) au bout de 24h et 85,55mM pour la souche (S) au bout de 16h.

L'acidification du lait a lieu au cours de cette phase avec une baisse de pH de 1,6 unité pour la souche (AMa) et 1,94 unité pour la souche (S). La phase de croissance précède une phase entre 16h et 24h au cours de laquelle la croissance de la souche (S) est ralentie alors que la glycolyse et l'acidification sont maintenues, avec cependant des vitesses bien inférieures à celles de la phase de croissance. Seulement 1,11mM de lactate supplémentaire sont produits entraînant une baisse de 0,21 unités de pH. Pour la souche (AMa) la cinétique d'acidification ne met pas en évidence cette deuxième phase.

Pendant la phase de déclin, entre 24h et 72h, la croissance est très faible, elle atteint des valeurs minimales de 8,2Log ufc/ml et 7,8Log ufc/ml pour les souches (AMa) et (S), la

production de lactate est très faible, elle est de 4,45mM pour (AMa) et de 8,89mM pour (S) ce qui ne varie le pH que très faiblement, il est de l'ordre de 5,1 pour (AMa) et 4,69 pour (S).

Le lait écrémé permet une croissance pratiquement différente des deux souches, avec un taux de croissance de $0,54h^{-1}$ et un temps de génération de 113min pour la souche (AMa) et un taux de croissance de $0,43h^{-1}$ et un temps de génération de 139min pour la souche (S). La vitesse maximale d'acidification est de $1,15 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ et $2,11 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ pour les souches (AMa) et (S) respectivement. Le **tableau9** récapitule les différents paramètres de la cinétique de croissance de *Leuconostoc.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc.mesenteroides* subsp.*cremoris* (S).

Tableau 9 : représentation des paramètres relatifs à la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*cremoris* (S) sur milieu lait écrémé à 37°C.

Phases	paramètre	AMa	S
croissance	pH _i	7	7
	μ	0,54h ⁻¹	0,43h ⁻¹
	G	111min	139 min
	V _{max}	$1,15 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$	$2,11 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$
ralentissement	Temps	La cinétique	16h-24h
	Abaissment de pH	d'acidification ne met	O, 21 upH
	Production d'acide	pas en évidence cette phase.	1,11mM
Déclin	Temps	24h-72h	24h-72h
	Biomasse à 72h	8,2Logufc/ml	7,8Logufc/ml
	pH _f	5,1	4,69

pH_i : pH initiale, μ : taux de croissance (h⁻¹), G : temps de génération (min), V_{max} : vitesse d'acidification maximale, pH_f : pH finale.

Discussion

Au cours de ce travail nous avons isolé les bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud algérien, parmi les isolats seules les souches à Gram positif et catalase négative ont été retenues, ces 31 souches sous forme de coque ont été identifiées au niveau du genre par les méthodes phénotypiques.

Nous avons isolé 3 souches (19Ma, 19Mb, 19Mc) appartenant au genre *Weissella*, elles produisent toutes du gaz à partir du glucose, possèdent l'enzyme ADH, produisent du dextrane en milieu hypersaccharosé et poussent à 45°C.

Les isolats (AMa, AMc, S, H, W₁, W₃) appartiennent au genre *Leuconostoc*, ils produisent du gaz à partir du glucose, ne possèdent pas d'ADH, 83% produisent du dextrane en milieu hypersaccharosé (AMa, AMc, H, W₁, W₃), cette substance d'intérêt technologique est très recherchée pour ces différentes applications aussi bien dans le secteur pharmaceutique (prophylaxie de la thrombose, l'amélioration rhéologique..) que dans le secteur agroalimentaire (texture des produits), nous avons pu isoler les espèces *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMc) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* capable de croître à 45°C, d'après **Saidi et al (2005)** le lait de chamelle est très pauvre en *Leuconostoc* lors de ses travaux il a isolé des lactocoques dont l'espèce majoritaire est *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, par contre les travaux de **Zarour et al (2012)** ont confirmé la présence de *leuconostoc* dans le lait de chamelle algérien.

Le genre *Lactococcus* est représenté par les souches (19a₂, 19c₁, 16Ma, 16Mc, 16a₂, 16c₂, 5Ma, 5Mc, 5Me, 5a, c, 6Ma, 6Mc, 12L) elles sont toutes homofermentaires et ne poussent pas à 6,5% NaCl, 21% d'entre elles sont thermophiles (poussent à 45°C).

Les résultats de notre étude indiquent des particularités des coques lactiques isolés du lait de chamelle algérien, la littérature rapporte que les espèces des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont mésophiles mais des travaux plus récents (**Drici et al., 2009**) ont montré que des souches appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* et identifiées par les méthodes de biologie moléculaires pouvaient pousser à 50°C, ceci s'explique probablement par l'adaptation de la flore du lait de chamelle aux conditions environnementales extrêmes des zones arides du sud algérien. Une souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* poussant à 45°C a été isolée de lait de chamelle algérien (**Badis et al., 2005**) une autre étude sur l'influence de la température sur la

croissance des lactocoques isolées du lait de chamelle au PAKISTAN révèle la présence d'une souche de *Lactococcus.lactis* dont la température optimale de croissance est de 40°C, ce pendant sa croissance ralenti à 43°C (**Toqeer et al., 2006**).

Le genre *Enterococcus* est représenté par les souches (16Mb, 12Ma, 12Mb, 12Mc, 12Md, 12Me, 5Md, 5Mb), elles sont homofermentaires, résistent au pH basique (9,6), poussent en présence de NaCl 6,5%.

Parmi les objectifs de ce travail est d'avoir une meilleure compréhension du comportement acidifiant des lactocoques et des leuconostoc isolés du lait cru de chamelle du sud algérien, l'ensemble de ces cultures a permis d'obtenir un grand nombre de données qui vont permettre de comparer ces souches à celle déjà sélectionné par d'autres auteurs, ainsi en **2005 Raynaud** a étudié la cinétique de deux souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* d'origine fromagère fournies par la société Soredab, l'une d'elle présente presque le même comportement que nos souches avec un taux de croissance $\mu=0,5 \text{ h}^{-1}$ et un pH à 24h de 4,87 ($\text{pH}_{12\text{L}}=4,8$, $\text{pH}_{5\text{Me}}=4,85$), par contre l'autre souche possède un $\mu=0,73$. La même espèce isolée du lait de vache (**Moulay et al., 2006**) présente une vitesse de croissance plutôt faible ($\mu=0,12 \text{ h}^{-1}$) avec une vitesse maximale d'acidification plus importante

$V_{\text{max}}=4,66 \cdot 10^{-3} \text{ upH} \cdot \text{min}^{-1}$ comparé à celle de (12L) et (5Me) $V_{\text{max}}=2 \cdot 10^{-3} \text{ upH} \cdot \text{min}^{-1}$ par contre le pH à 24h ne diffère pas trop de nos souche il est de l'ordre de 4,29. En **2005 Saidi et al** déclare que le groupe de bactéries mésophiles isolé du lait cru de chamelle d'Algérie sont représentés par la sous espèce de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, celle-ci est plus acidifiante (plus de 100mM d'acide lactique après 24h) que les souches (12L) et (5Me) qui produisent respectivement 76,66 mM et 87,77 mM. L'espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (AMa) quand à elle possède un $V_{\text{max}}=1,15 \cdot 10^{-3} \text{ upH} \cdot \text{min}^{-1}$ sa vitesse d'acidification est plus rapide que celle isolé par (**Zarour et al., 2012**) dont $V_{\text{max}}=0,6 \cdot 10^{-3} \text{ upH} \cdot \text{min}^{-1}$.

Conclusion

Le secteur industriel agroalimentaire porte un grand intérêt aux ferments lactiques, à ce fait l'exploitation de différents écosystèmes laitiers et la recherche de microflore d'intérêt technologique, présentant une diversité tant au niveau des espèces qu'au niveau des souches; s'avère très importante. L'étude de la microflore du lait de chamelle des régions arides du sud algérien, nous a permis de mettre en évidence une biodiversité physiologique des lactocoques et des leuconostoc, les données bibliographiques révèlent que ces derniers appartiennent à la flore mésophiles mais nos résultats confirme le contraire, les isolats *Lactococcus. lactis* subsp *lactis bivar diacetylactis* (12L) et (5Me), *Leuconostoc. mesenteroides* subsp *mesenteroides* (AMa) et *Leuconostoc. mesenteroides* subsp *cremoris* (S) présentent un caractère thermophile atypique et poussent à 45°C. Par ailleurs, les résultats technologiques sont satisfaisants, l'étude cinétique révèle que nos lactocoques possèdent pratiquement les même vitesse de croissance et la même cinétique d'acidification que des souches utilisé en industrie fromagère par la société Soredab (**Raynaud *et al.*, 2005**). 83% des espèces du genre *Leuconostoc* produisent du dextrane, substance très recherché autant en industrie alimentaire qu'en industrie pharmaceutique. Il est important de signaler la présence de *Leuconostoc. mesenteroides* subsp *cremoris* car cette souche est rarement isolée du lait cru de chamelle. L'électrophorèse des protéines totales sur gel polyacrylamide SDS a permis de comparer les profils protéiques des souches, cette technique rapporte la confirmation de l'identification phénotypique des isolats.

References

- Achtman. M, Wagner. M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. Nat. Rev. Microbiol. (In press).
- Anonyme AMNI.(2012).Rapport sur le Festival AMNI / Thintarabine, TAMANRASSET Ministère de l'Agriculture et du Développement RuralHaut-Commissariat au Développement de la Steppe.
- Anonyme RDP (2008). Ribosomal Database Project II. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://rdp.cme.msu.edu>>, consulté le 02 juin 2008.
- Ayadi. M, Hammadi. M, Khorchani. T, Barmat. A, Atigui. M, Caja. G. (2009). J. Dairy Sci., 92, 1452-1459.
- Badis.A, Guetarni.D, Moussa-Boudjema. B, Henni. J.E, Kihal .M.(2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races. Food Microbiol., 21: 579-588.
- Badis. A , Laouabdia-Sellami. N, Guetarni. D, Kihal. M, Ouzrout. R.(2005). Caracterisation phenotypique des bacteries lactiques isolees à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales Arrabia et Kabyle. Sci. Technol., 23: 30-37.
- Boubekri.K and Yoshiyuki.O. (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional crheese, El-Klila, Journal of the Science of Food and Agriculture, 170, pp: 501-505.
- Boumehira.A.Z, Mami.A, Hamed.A.R, Henni.J.E, Kihal.M. (2011). Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria. JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, Vol. 5(2), p. 553-566
- [Bradford. M.M.](#) (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248 -254.
- Brenner.D.J, Staley J.T, Krieg N.R. (2005).Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 27-32
- Brenner. D.J, Fanning. G.R, Rake.A.V, Johnson.K.E. (1969).Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite.*Anal.Biochem.* 28, 447-459

- Cai. H, Rodríguez. B.T, Zhang. W, Broadbent.J.R, Steele.J.L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiol.* 153, 2655-2665
- Chagnaud P., Machinis K., Coutte L.A., Marecat A. & Mercenier A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Meth.* 44, 139-148
- Coeuret. V, Dubernet. S, Bernardeau. M, Gueguen. M, Vernoux. J.P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* 83, 269-306
- Cohan.F.M and Perry.E.B. (2007). A systematic for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr. Biol.* 17, R373-R386
- Crosa. J.H, Brenner. D.J, Falkow. S. (1973). Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* 115, 904-911
- Curk.M.C, Boeufgras.J.M, Decaris. B, Gavini. F, Kersters. K, Larpent. J.P, Le Bourgeois. P, Renault. P, de Roissart. H, Rouvier. C. (1994). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques I*. Uriage, France : Loriga, p. 141-168
- Deen.A, Vyas.S, Jain.M, Sahani. M.S. (2004). *Israel J. Vet.Med.*, 2004, 59, 24-27
- De Ley. J, Cattoir. H, Reynaerts. A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12, 133-142
- De Roissart.H. (1986). Bactéries lactiques, P.343. In F. M. Luquet (ed), *Laits et produits laitiers : vaches, bœufs, chèvres*, vol.3. Lavoisier, Paris.
- Desmazeaud. M. (1996). Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, pp: 331-343.
- Devoyod. J.J. et Poullain. F. (1988). Les *Leuconostocs* propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Revue Le lait*, 68 (3), pp: 249-280.
- Drici. H, Gilbert. C, Kihal. M, Atlan. D. (2009). Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J. Applied Microbiol.*, 108: 647-657.
- Dziuba. B, Babuchowski. A, Nałęcz. D, Niklewicz. M. (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int. Dairy J.* 17, 183-189

FAO 2006 <http://www.fao.org/AG/AGAInfo/themes/fr/dairy/camel.html>

- Faye. B. (1997). Guide de l'élevage du dromadaire. CIRAD-EMVT, Montpellier, première édition, 126 p.
- Faye. B. (2004). Proc. of the 34th meeting FAO/ICAR (International Committee for Animal Recording). Session on camelids. 28 mai-3 juin 2004, Sousse (Tunisie)
- Ferraz P.N., Menezes C.C.P., Danelli G.M., Lizeu J.O.P., Nasciemento E.R., Lucchesi M.D. (2000). Protein profile analysis by SDS-PAGE of *Mycoplasma gallisepticum* strains S6(208) and F-K810 growth in hayflick's and frey's media. *Brasilian. J. Microbiol.* 31. 2: 11-17.
- Ghazi f, Benmechernene Z., Aggad H., Guessas B., Moussa-boudjamaa B., Henni D. et Kihal M. (2006). Phenotypic identification and whole cell protein analysis by sds-page of dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *Journal Algerien des Zones Arides* 5 : 25-35.
- Gillis. M, Vandamme. P, De Vos. P, Swings. J, Kersters. K. (2005). Polyphasic taxonomy. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 43-48
- Grimont. P.A.D, Popoff. M.Y, Grimont. F, Coynault. C, Lemelin. M. (1980). Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* 4, 325-330
- Hammes. W.P, Vogel. R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In Wood B.J.J. & Holzapfel W.H., eds. *The genera of lactic acid bacteria*. Glasgow, UK : Blackie academic & professional, p. 19-54
- Huys. G, Vancanneyt. M, D'Haene. K, Vankerhoven. V, Goossens. H, Swings. J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* 157, 803-810
- Jouany. J.P. (2000). *INRA Prod. Anim.*, 13, 165-176
- Jones. D. (1978). Composition and differentiation of genus *Streptococcus*. In: *Streptococci*. Skinner, F. A., Quesnel, L. B., Eds. Academic Press, London, pp: 1-49.
- Kempler. G.M et Mc Kay. L.L, (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylacti* , *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39, pp. 956-927.

- Kihal.M, Bensoltane.A, Saidi.Dj. (2000). La flore lactique du lait cru de chamelle (*Camelus dromedarius*) d'Alger. Camels newslatter, ACSAD, p.64.
- Koeppel. A, Perry. E.B, Sikorski. J, Krizanc. D, Warner. A, Ward. D.M, Rooney.A.P, Brambilla. E, Connor. N, Ratcliff. R.M, Nevo. E, Cohan F.M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics.PNAS 19, 2504-2509.
- Krieg.N.R. (2005).Identification of procaryotes. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 33-38
- Mami.A, Boumehira.A.Z, H.A. Rizk, Henni.J.E, Kihal.M. (2012). Screening of Autochthonous *Lactobacillus* Species from Algerian Raw Goats' Milk for the Production of Bacteriocin-Like Compounds Against *Staphylococcus Aureus*. Afr. J. Biochem., 11: 4595-4607.
- Masco. L, Huys. G, Gevers. D, Verbruggen. L, Swings. J. (2003).Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. Syst. Appl. Microbiol. 26, 557-563
- Mayeux.J.V, Sandine. W.W.E, Elliker. P.R, (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures, J. Dairy. Sci., 45, pp. 655-656.
- Mehlen.A, Goeldner. M, Ried. S, Stindl. S, Ludwig. W, Schleifer. K.H. (2004).Development of a fast DNA-DNA hybridization method based on melting profiles in microplates. Syst. Appl. Microbiol. 27, 689-695.
- Ministere de l'Agriculture, Le dromadaire en Algérie,CIHEAM –Options Mediterraneennes
- Moulay.M, Aggad.H, Benmechernene.Z, Guessas.B, Henni.J. ED, Kihal.M. (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. World Journal of Dairy & Food Sciences 1 (1): 12-18, ISSN 1817-308X
- Naumann. D, Fijala. V, Labischinski. H, Giesbrecht. P. (1988). The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. J. Mol. Struct. 74, 165-170

- Novel. G. (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau. J.Y, Bouix. M, Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp:170-374.
- Oguntoyinbo.F.A. (2007). Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production. World J. Microbiol.Biotechnol. 23, 1425-1432
- Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M., Loubière P.(2005). Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12) : 8016-8023.
- Ryhänen.E.L, Särkkä-Tirkkonen.M, Mantere-Alhonen.S. (1996). Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented wheat drink. Microbiologie Aliment Nutrition, 14 (4), pp 369-372.
- Sanchez I., Sesena S., Palop L., (2003). Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplant by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. Int. J. Food. Microbiol. 2555: 181-189.
- Sandine.W.E. (1988).New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. Biochimie, 70, pp: 519-522.
- Saidi. N, Hadadji. M, Guessas. B.(2011). Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk, Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 6 (3): 154-161, 2011 ISSN 2078-466X
- Saidi. J, Kihal. M, Hamama. A, Chekroun. A, Henni. J, Kheroua. O. (2005).Characterization of Algerian raw camel's milk identification of dominant lactic acid bacteria and protein analysis.
- Suhigara.T.F. (1985). The Lactobacilli and Streptococci: bakery products. In: Bacterial Starter Cultures for Foods.Gilliland S.E. Eds. CRC Press Boca Raton. Florida, 9, pp: 120-125.
- Stackebrandt. E, Frederiksen. W, Garrity .G.M, Grimont.P.A.D, Kämpfer. P, Maiden M.C.J, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings. J, Trüper. H.G, Vauterin.L, Ward .A.C, Whitman.W.B. (2002).Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1043-1047

- Stackebrandt.E. (2003). The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. Food Technol. Biotechnol. 41, 17-22
- Stackebrandt .E and Ebers. J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today 33, 152-155
- Staley. J.T, Krieg N.R. (1984). Classification of procaryotic organisms: an overview. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1-4
- Sumner. J. M, McNamara. J. P. (2007). J. Dairy Sci. 90, 5237–5246
- Tae-Woon. K, Jung. S.H, Lee. J.Y, Choi.S.K, Park .S.H, Jo. J.S, Kim. H.Y. (2003). Identification of lactic acid bacteria in Kimchi using SDS-PAGE profiles of whole cell proteins. J. Microbiol. Biotechnol. 13, 119-124
- Temmerman. R, Huys. G, Swings. J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-independent methods. Trends Food Sci. Technol. 15, 348-359
- Theunissen. J, Britz. T.J, Torriani. S, Witthuhn. R.C. (2005).Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis.Int. J. Food Microbiol. 98, 11-21
- Thomas. T.D. (1973).Agar medium for differentiation of Streptococcus cremoris from the other bacteria”, N.Z.J. Dairy.Sci. Technol, 8, pp. 70-71.
- Toqueer.A, Rashida.K, Najma.A. (2006). Influence of temperarrure on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from Camel milk. Biotechnology 5(4): 481-488. ISSN 1682-296x.
- Vandamme. P, Pot. B, De Vos. P, Kersters. K, Swings. J. (1996).Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev 60, 407-438
- Wilson.R.T. (1998). The Tropical Agriculturalist: Camels. Macmilan Education Ltd. London and Basingstoke
- Wilson.R.T. (1989).The one-humped camel in the word.Options Méditerranéennes Série Séminaires. 2 :15-17.
- Woese.C.R. (1987).Bacterial evolution.Microbiol. Rev. 51, 221-271
- Wood.B.J.B. (1995).The lactic acid bacteria. In Wood B.J.B. & Holzapfel W.H., eds. The genera of lactic acid bacteria.London : Chapman & Hall, series preface
- Wiebe.G.J, Pershad. R, Escobar. H, Hawes. J.W, Hunter. T, Jackson-Machelski .E, Knudtson .K.L, Robertson. M, Thannhauser. T.W. (2003).DNA sequencing research group (DSRG) 2003 – A general survey of core DNA sequencing facilities.J. Biomol. Tech. 14, 231-237

- Wuyts. J, Perrière. G, Van de Peer. Y. (2004). The European ribosomal RNA database. Nucleic Acids Res. 32, D101-D103
- Zarour.K, Benmechernene.Z, Hadadji.M, Moussa-Boudjemaa.B, Henni.J D, Kihal.M. (2012). Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(13), pp. 3192-3201,ISSN 1996-0808 ©2012 Academic Journals.

Annexes

Annexe I

Milieux de culture utilisés :

Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25 g
MnSO ₄	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

PH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes

Milieu MRS-BCP sans extrait de viande

MRS sans extrait de viande (milieu liquide)	1000 ml
Pourpre de Bromocrésol	0,025 mg
pH = 7.0	

Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé (121°C, 15min). Au moment de l'emploi, 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) sont ajoutés. Ces solutions sont stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) et sont conservées à l'obscurité à +4°C.

Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Lactose	2 g
Biopolytone	5 g
Peptone papainique de soja	5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Acétate de sodium	1,8 g
L-Arginine	4 g
Pourpre de bromocrésol	0,05 g
Agar	10 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,5

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Citrate de sodium	1 g
Glucose	5 g
Gélatine	2,5 g
Azothydrate de sodium	0,075 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,5

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7 Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Lait écrémé

Lait écrémé	100 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7

Autoclavage 110°C, 10 minutes.

Annexe II

Composition des gels acrylamides

Produits	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (15%)
Acrylamide (30%)	2,5ml	5 ml
Bis-acrylamide (1%)	3,9 ml	1,03ml
Tampon de séparation (pH=8,8)	/	2,7 ml
Tampon de concentration (pH=6,8)	3,75 ml	/
H ₂ O (ml)	4,65 ml	1,4 ml
SDS (10%)	150µl	66,66 µl
Persulfate d'amonium (10%)	100 µl	100 µl
TEMED	50 µl	50 µl

Tampon de séparation (Tris 3M)

- Tris.....36, 3 g
- Eau distillée q.s.p.....100ml

Tampon de concentration (Tris 1,2M)

- Tris.....3 g
- Eau distillée q.s.p.....20ml

Tampon de charge

- Tris.....0, 15g
- SDS.....0, 4g
- Glycerol.....1ml
- β mercaptoéthanol.....0, 5ml
- Bleu de bromophénol.....0, 01g
- Eau distillée q.s.p.....5ml

Tampon de migration

- Tris.....3, 03g
- SDS.....1g
- Glycine.....14, 4g
- Eau distillée q.s.p.....1000ml

Le tampon est conservé au réfrigérateur à 4°C, pH=8,3

Solution de coloration

- Bleu de coomassie.....1,5g
- Ethanol.....250ml
- Acide acétique.....40ml
- Eau distillée q.s.p.....1000ml

Solution de décoloration

- Ethanol.....250ml
- Acide acétique.....200ml
- Eau distillée q.s.p.....1000ml

Résumé

Le lait de chamelle constitue une source importante pour la sélection de nouvelles souches lactiques d'intérêt industriel. Notre thèse s'appuie sur la recherche de bactéries lactiques présentes dans le lait cru de chamelle d'ALGERIE. Les données bibliographiques révèlent que certaines bactéries lactiques possèdent des caractères thermophiles atypiques aux bactéries lactiques dites mésophiles.

Les techniques microbiologiques ont permis d'isoler un certain nombre de germes thermophiles, les analyses phénotypiques ont permis l'identification des espèces du genre *Leuconostoc* spp et *Lactococcus* spp.

Les espèces de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *biovar. diacetylactis* ont montré un caractère de thermophilie en poussant à 45°C. Leurs aptitudes technologiques ont été aussi recherchées par l'étude de la cinétique de croissance sur milieu lait. Une approche d'identification par leur profil protéique a été aussi entamé. Ce travail nous a permis de révéler la présence de bactéries lactiques à caractère atypique du lait cru de chamelle d'ALGERIE.

Mots clés :

Lait De Chamelle; Bactéries Lactique; Cinétique De Croissance; Cinétique D'acidification; *Lactococcus*; *Leuconostoc*; Thermophiles; Protéines Solubles; Gel Polyacrylamide; SDS-PAGE.