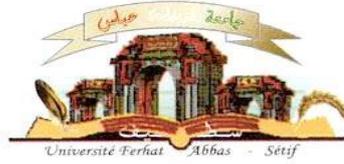


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas, Sétif 1
Faculté des Sciences de la Nature et
de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2020

Thèse

Présentée par

BOUGUERRA Asma

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à
partir du lait de chamelle

Soutenue publiquement le : **11/04/2021**

DEVANT LE JURY

Président	YAHIAOUI Bilal	MCA	U. Ferhat Abbas Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr	U. Ferhat Abbas Sétif 1
Examineurs	AIT KAKI Asma	MCA	U. Med. BOUGARA Boumerdes
	HENDEL Noui	MCA	U. Med. BOUDIAF M'sila
	TOUATI Noureddine	MCA	U. Med. Bachir el IBRAHIMI B.B.A.

Laboratoire de Microbiologie appliquée

Remerciements

*Je remercie en premier lieu mon directeur de thèse, Pr. **HARZALLAH Daoud** pour avoir accepté la responsabilité de diriger ce travail. Ses qualités humaines exceptionnelles, ses conseils, son encouragement et ses orientations m'ont été précieux. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.*

*J'exprime mes respectueux dévouements à Dr. **YAHIAOUI Bilal** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider la commission d'examen de cette thèse. J'aimerais remercier vivement les membres de jury ; Dr. **AIT KAKI Asma**, Dr. **HENDEL Noui** et Dr. **TOUATI Nouredine** d'avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail.*

*Un grand merci à Dr. **Ina Salwany Md Yasin**, département d'aquaculture, UPM – Malaisie- pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour l'identification moléculaire des bactéries probiotiques.*

*Un remerciement chaleureux à Pr. **KHENOUF S.** et Pr. **DEHAMNA S.** département de physiologie, université Ferhat Abbas- Sétif- pour leur assistance technique.*

*Je remercie fortement Dr. **SILVARAJ S.** et Mr. **FERAH N.** pour leur aide et merci pour toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

Je dédie ce modeste travail à :

- L'âme de ma chère grand-mère
- Mes chers parents
- Mon époux
- Mes enfants
- Mes frères, sœurs, nièces et neveux

الملخص

من أجل تقييم الجودة الميكروبيولوجية لحليب النوق، تم أخذ 13 عينة من كل ناقة على حدى في ظروف صحية صارمة من مناطق مختلفة من جنوب شرق الجزائر. نتائج القياسات بينت أن قيم الـ pH تتغير من (6,46-6,77) كما أرجعت جميع عينات الحليب أزرق الميثيلين بعد أربع ساعات، مما يشير إلى أنه من المحتمل أن يكون ذا جودة ميكروبيولوجية جيدة. لوغاريتم عدد الخلايا / مل لكل من: *FAMT*، *Enterococcus*، *Staphylococcus spp.*، الخمائر والعفنات تراوح ما بين (1,69-3,25)، (1,69-3,17)، (00، 3,9) و (0,95-2,3) على الترتيب. عدد *Enterobacteriaceae* كان منعدما في 69,23% من عينات الحليب التي تم فحصها ولم يتجاوز لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستعمرات 1,30 / مل. من هذه النتائج، يبدو أنه على الرغم من أن حلب حليب النوق وتخزينه ونقله تم في ظروف صحية جيدة؛ غير أننا سجلنا نسبة مرتفعة من *Staphylococcus spp.* مما يحذر من استهلاكه في الحالة الخام خاصة من طرف الأشخاص ذوو مناعة ضعيفة.

تم تخمير العينات السابقة تلقائياً لعزل ودراسة خصائص سلالات بروبيوتيك جديدة محتملة من البكتيريا اللبنية. 9 سلالات فقط من أصل 78 بكتيريا اللبن تعتبر بروبيوتيك. كلها فعالة ضد البكتيريا المسببة للأمراض ولها خصائص لاصقة. لم تكن هناك سلالة قادرة على النمو لما يكون pH الوسط مساويا لـ 2 في حين جميعها أظهرت مقاومة عالية عند pH 3 مقارنة بالأمثل (6,2). بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع السلالات تحملاً جيداً للأملح الصفراوية. لكن ولا عزلة بكتيرية تحملت 0,4% من الفينول خلال 24 ساعة من التعرض.

أظهرت نتائج السلامة لسلالات البروبيوتيك التسعة المشتبه بها غياب نشاطية β ، *hémolytique*، الجيلاتيناز، *DNase*، والتخثر. كما أنها حساسة لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم تحديد النمط الظاهري لها على أنها تنتمي إلى جنس *Leuconostoc* و أظهرت تسلسلات النيوكليوتيدات في *ARNr16S* تشابه بنسبة 94-99% مع *Leuconostoc mesenteroides*.

تم تقييم الخصائص الغذائية والتكنولوجية لهذه السلالات. أظهرت النتائج أن جميعها قادرة على استقلاب اللاكتوز، وإنتاج ثنائي الأسيتيل من السترات، وتحلل البروتينات بأقطار تتراوح بين: (18,5 م - 29 م) ممثلة بـ MS11 و MS12 على التوالي. ومع ذلك، فهي ليست محللة للدهون أو النشاء وغير قادرة على إنتاج الأسيتوين. باستثناء سلالتين ضعيفتي المحوضة (MS4 و MS12)، باقي العزلات الأخرى لا تحمض الحليب. أما القدرة على تخمير الكربوهيدرات (الجلوكوز، السكروز، اللاكتوز، الفركتوز، FOS) فإنها مختلفة بين العزلات البكتيرية السابقة.

أشارت النتائج الإيجابية المتحصل عليها في هذه الدراسة أن حليب النوق رغم خصائصه الطبية والعلاجية إلا أن استهلاكه على الشكل الخام ليس سليماً، كما أنه بعد تخميره يحتوي على عزلات تنتمي إلى *Leuconostoc mesenteroides* يمكن أن تكون مرشحة لأن تكون بكتيريا بروبيوتيك باستعمالات تكنولوجية واعدة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبن، بروبيوتيك، الجودة الميكروبيولوجية، الخصائص التكنولوجية، حليب النوق، *Ln. mesenteroides*

Résumé

Afin d'évaluer la qualité microbiologique du lait de chamelle du sud-est algérien, 13 chammelles ont été prélevées selon les normes d'hygiène. Les valeurs de pH varient entre (6,46-6,77) et tous les échantillons de lait ont eu pour effet de réduire le bleu de méthylène après 4 heures, indiquant qu'il est probablement de bonne qualité microbiologique. Le nombre (Log/mL) de la FAMT, *Enterococcus*, *Staphylococcus* spp., levures et moisissures est compris entre (1,69-3,25), (1,69-3,17), (00-3,39) et (0,95-2,3) respectivement. Les entérobactéries sont absentes dans 69,23% des échantillons de lait examinés et n'ont pas dépassé Log 1,30 UFC/mL. D'après ces résultats, il s'avère que même si les conditions d'hygiène de la traite, du stockage et du transport du lait de chamelle sont améliorées ; une fréquence relativement élevée de *Staphylococcus* spp. a été notée ce qui limite sa consommation à l'état cru surtout par les personnes immunodéprimées.

Ces échantillons de lait ont été fermentés spontanément pour isoler et étudier *in vitro* les caractéristiques de nouvelles souches probiotiques. Seulement 9 souches sur 78 LAB isolées ont des propriétés probiotiques. Elles sont toutes actives vis-à-vis des bactéries pathogènes et possèdent des propriétés adhésives importantes. Aucune souche n'a pu se développer au pH 2 mais toutes ont montré une résistance considérable à pH 3 par rapport à celui optimum (pH 6,2). De plus, toutes les souches ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires. Néanmoins, aucune souche n'a pu résister à 0,4% de phénols pendant 24 h d'exposition. L'évaluation de leur sécurité a montré l'absence d'une activité β . hémolytique, gélatinase, DNase et coagulase. Comme elles sont sensibles à la plupart des antibiotiques testés. Ces souches probiotiques sont identifiées phénotypiquement comme appartenant au genre *Leuconostoc*. Les séquences nucléotidiques de leur ARNr 16S ont montré une similitude de 94 à 99 % avec *Leuconostoc mesenteroides*.

Les propriétés nutritionnelles et technologiques de ces souches ont été évaluées. Les résultats montrent que toutes les souches sont capables de métaboliser le lactose, de produire le diacétyl à partir du citrate, de dégrader les protéines avec des diamètres de lyse variant entre : (18,5 mm-29 mm) représentés par les souches MS11 et MS12 respectivement. Toutefois, elles ne sont pas lipolytiques ni amylolytiques et incapables de produire l'acétoïne. A l'exception de 2 souches faiblement acidifiantes (MS4 et MS12), les autres n'acidifient pas le lait. Une capacité de fermentation des glucides (glucose, saccharose, lactose, fructose, FOS) est variable entre les souches.

Les résultats globaux obtenus indiquent l'insécurité de consommation du lait de chamelle à l'état cru et que les isolats de *Leuconostoc mesenteroides* pourraient servir comme candidats probiotiques et technologiques prometteurs.

Mots clés : LAB, lait de chamelle, *Ln. mesenteroides*, probiotique, propriétés technologiques, qualité microbiologique.

Abstract

In order to evaluate the microbiological quality of camel milk from south-eastern Algeria, 13 camels were sampled according to hygiene standards. The pH values ranged from (6.46-6.77) and all milk samples reduce methylene blue after 4 hours, indicating that it is probably of good microbiological quality. The number (Log/mL) of FAMT, *Enterococcus*, *Staphylococcus* spp., yeasts and moulds is ranging from: (1.69-3.25), (1.69-3.17), (00-3.39) and (0.95-2.3) respectively. *Enterobacteriaceae* were absent in 69.23% of the milk samples examined and did not exceed Log 1.30 CFU/mL. From these results, it appears that although the hygienic conditions of milking, storage and transport of camel milk are improved; a relatively high frequency of *Staphylococcus* spp. was noted, which limits its consumption in the raw state especially by immunocompromised persons.

These milk samples were spontaneously fermented to isolate and study *in vitro* the characteristics of new probiotic strains. Only 9 strains out of 78 LAB isolated have probiotic properties. They are all active against pathogenic bacteria and have important adhesive properties. No strain was able to develop at pH 2 but all showed considerable resistance at pH 3 compared to the optimum pH (pH 6.2). In addition, all strains showed a good tolerance to bile salts. Nevertheless, no strain was able to resist 0.4% phenols for 24 hours of exposure. The evaluation of their safety showed the absence of β . hemolytic activity, gelatinase, DNase and coagulase. As they are sensitive to most of the antibiotics tested. These probiotic strains are phenotypically identified as belonging to the genus *Leuconostoc*. The nucleotide sequences of their 16S rRNA showed 94-99% similarity to *Leuconostoc mesenteroides*.

The nutritional and technological properties of these strains have been evaluated. Results show that all strains are capable of metabolizing lactose, producing diacetyl from citrate, degrading proteins with lysis diameters ranging from: (18.5 mm-29 mm) represented by strains MS11 and MS12 respectively. However, they are neither lipolytic nor amylolytic and are incapable of producing acetoin. With the exception of 2 weakly acidifying strains (MS4 and MS12), the others do not acidify milk. The ability to ferment carbohydrates (glucose, sucrose, lactose, fructose, FOS) varies between strains.

The overall results obtained indicate that camel milk is unsafe to consume in its raw state and that *Leuconostoc mesenteroides* isolates could serve as promising probiotic and technological candidates.

Key words: camel milk, LAB, *Ln. mesenteroides*, probiotic, technological properties, microbiological quality.

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

ANOVA : Analysis of Variance

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal

ATCC : American Type Culture Collection

B. : *Bifidobacterium*

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CN : Caséine

DO : Densité Optique

E. : *Enterococcus*

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Food Agriculture Organisation

FAMT : Flore Aérobie Mésophile Totale

FOS : Fructo-Oligosaccharides

GC : Guanine et Cytosine

GRAS : Generally Recognized As Safe

IBD: Inflammatory Bowel Disease

IBS: Irritable Bowel Syndrome

LAB : Bactéries lactiques

Lb. : *Lactobacillus*

LDL : Low Density Lipoprotein

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

MRS : De Man, Rogosa and Sharpe

MG : Matière Grasse

MU : Miller Units

p/v : poids/volume

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGRP : Peptidoglycan Recognition Protein

SD : Standard Deviation

spp. : plusieurs espèces

Subsp. : Sous espèce

TGI : Tractus Gastro-Intestinal

UFC : Unités Formant Colonies

UV : Ultraviolet

v/v : volume/volume

WHO : World Health Organization

WFN : Water Free Nuclease

Liste des tableaux

Tableau 1. LAB productrices de bactériocines isolées à partir du lait de chamelle et leurs produits fermentés (Rahmeh et <i>al.</i> , 2019).....	7
Tableau 2. Présentation des espèces des bactéries lactiques ^{a,b} (Vandamme et <i>al.</i> , 2014).....	14
Tableau 3. Les souches lactiques utilisées dans les différents aliments fermentés (Chen et Hang, 2019).	19
Tableau 4. Les microorganismes probiotiques (Konuray et Erginkaya, 2017).....	21
Tableau 5. Bactéries lactiques et bifidobactéries isolées d'endocardites, de bactériémies et d'infections sanguines locales (Ishibashi et Yamazaki, 2001).....	33
Tableau 6. Nombre des échantillons du lait de chamelle et périodes de collecte.	36
Tableau 7. Milieux et conditions de culture des microorganismes dénombrés.....	38
Tableau 8. Nombre des microorganismes (Log UFC/mL) dans les échantillons du lait de chamelle.....	41
Tableau 9. Liste des souches pathogènes.	44
Tableau 10. Liste des antibiotiques utilisés pour évaluer la sensibilité des souches présumées probiotiques.	50
Tableau 11. Composition du mélange réactionnel (PCR).....	53
Tableau 12. Taux de survie des neuf souches lactiques à l'acidité.	65
Tableau 13. Taux de survie des neuf souches lactiques aux sels biliaires.	66
Tableau 14. Résistance des souches lactiques à 0,4% de phénols	68
Tableau 15. Antibiogramme des souches lactiques sélectionnées.	73
Tableau 16. Contribution des variables aux facteurs dans l'ACP basée sur la corrélation.	76
Tableau 17. Identification phénotypique des isolats probiotiques.	81
Tableau 18. Proximités phylogénétiques des bactéries sur la base de la similarité avec la séquence partielle de l'ARNr 16S.....	83
Tableau 19. Diamètres (mm) de protéolyse obtenus par les souches probiotiques sur le milieu PCA au lait (10%).	94

Liste des figures

Figure 1. Métabolisme des citrates chez les espèces des genres <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i> (Mayo et al., 2010).	15
Figure 2. Diagramme des systèmes protéolytiques chez LAB (Mayo et al., 2010).	17
Figure 3. Représentation schématique de la terminologie relative aux probiotiques (Rossoni et al., 2020).	23
Figure 4. Mécanismes d'action majeurs des probiotiques (Bermudez-Brito et al., 2012).	26
Figure 5. Représentation schématique des étapes séquentielles requises depuis la sélection des probiotiques jusqu'au lancement du produit final sur le marché (Pintado et al., 2014a). ..	28
Figure 6. Quelques effets bénéfiques des probiotiques sur la santé (Bajaj et al., 2015).	35
Figure 7. Localisation des sites de prélèvement des échantillons du lait camelin.	37
Figure 8. Graphiques en nuage de points de la flore aérobie mésophile totale (FAMT), <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., levures et moisissures présents dans les échantillons du lait de chamelle.	40
Figure 9. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de M'sila contre les souches indicatrices.	56
Figure 10. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de Oued Souf contre les souches indicatrices.	57
Figure 11. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de Biskra contre les souches indicatrices.	57
Figure 12. Activité antibactérienne de quelques isolats lactiques contre certaines souches pathogènes.	58
Figure 13. Pourcentages d'hydrophobicité des souches actives.	61
Figure 14. Pourcentages d'auto-agrégation des souches actives.	62
Figure 15. Pourcentages de co-agrégation obtenus par les souches actives contre <i>E. coli</i>	63
Figure 16. Pourcentages de co-agrégations obtenus par les souches actives contre <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Figure 17. Aspect des colonies bactériennes sur la gélose au sang.	69
Figure 18. Détection de la gélatinase chez certaines souches présumées probiotiques.	70
Figure 19. Détection de DNase chez certaines souches présumées probiotiques.	70

Figure 20. Résultat du test de coagulase.....	71
Figure 21. Antibiogramme de la souche MR3.....	74
Figure 22. Représentation graphique des valeurs propres de la matrice de corrélation.	75
Figure 23. Analyse en composantes principales des propriétés probiotiques des souches lactiques isolées du lait de chamelle.....	76
Figure 24. Résultats de quelques tests utilisés pour l'identification phénotypique des isolats probiotiques.	80
Figure 25. Bandes d'ADN obtenues après séparation des produits d'amplification de l'ARNr 16S de chaque souche probiotique.	82
Figure 26. Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les souches probiotiques construit par la méthode de neighbor- joining.....	84
Figure 27. Fermentation de certains substrats glucidiques par les souches probiotiques.....	91
Figure 28. Aspect des colonies d'une souche <i>Ln. mesenteroides</i> sur la gélose MSE.	92
Figure 29. Utilisation du citrate (colonies bleues) par quelques souches probiotiques sur le milieu KMK.....	93
Figure 30. Activité protéolytique de quelques souches de <i>Ln. mesenteroides</i>	94
Figure 31. Evolution des cinétiques d'acidification des neuf souches probiotiques en fonction du temps sur le lait écrémé (0 % MG).....	97

Sommaire

Remerciements.....	i
المخلص.....	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Liste des abréviations.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Introduction.....	1
 Chapitre I : Revue bibliographique	
I.1. Le lait de chamelle	4
I.1.1. Composition chimique et valeur nutritionnelle.....	4
I.1.2. Microbiote du lait de chamelle.....	6
I.1.2.1. Microorganismes pathogènes et de détérioration.....	6
I.1.2.2. Microorganismes probiotiques et/ou d'intérêt technologique.....	7
I.1.3. Propriétés bénéfiques du lait de chamelle pour la santé	8
I.1.3.1. Activités antimicrobienne et antivirale	8
I.1.3.2. Activité anticancéreuse	9
I.1.3.3. Amélioration de la digestion du lactose	9
I.1.3.4. Traitement de l'autisme.....	9
I.1.3.5. Effet hypoglycémiant	10
I.2. Bactéries lactiques.....	11
I.2.1. Description et distribution	11
I.2.2. Classification	12
I.2.3. Métabolisme.....	13
I.2.3.1. Fermentation des carbohydrates.....	13
I.2.3.2. Fermentation des acides organiques.....	15
I.2.3.3. Fermentation des disaccharides.....	16
I.2.3.4. Protéolyse et lipolyse.....	16
I.2.4. Applications des bactéries lactiques dans les fermentations alimentaires.....	18
I.2.5. Bactéries lactiques avec des propriétés favorables à la santé	20
I.2.5.1. Le concept « probiotique ».....	20
I.2.5.2. Sources des probiotiques.....	24
I.2.5.3. Mécanismes d'action	24

I.2.5.4. Critères de sélection des probiotiques	27
I.2.5.5. Principales propriétés des probiotiques	29
I.2.5.5.1. Survie aux conditions de stress du TGI.....	29
I.2.5.5.2. Adhésion/colonisation du TGI	29
I.2.5.5.3. Activité antimicrobienne	30
I.2.5.6. Sécurité d'utilisation des bactéries probiotiques.....	32
I.2.5.7. Effets des probiotiques sur la santé	34
II.1. Introduction	36
II.2. Matériel et méthodes	36
II.2.1. Collecte du lait	36
II.2.2. Estimation de la qualité microbiologique et de l'acidité du lait	38
II.2.3. Analyse microbiologique	38
II.3. Résultats et discussion.....	39
II.3.1. Estimation de la qualité microbiologique et de l'acidité du lait	39
II.3.2. Analyse microbiologique	39
III.1. Introduction.....	43
III.2. Matériel et méthodes	43
III.2.1. Isolement des bactéries lactiques.....	43
III.2.2. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques	44
III.2.2.1. Dépistage du pouvoir antagoniste des isolats lactiques contre des bactéries pathogènes par le test des spots sur agar	44
III.2.2.2. Propriétés adhésives	45
III.2.2.2.1. Hydrophobicité	45
III.2.2.2.2. Auto-agrégation	45
III.2.2.2.3. Co-agrégation	46
III.2.2.3. Résistance aux conditions gastriques	46
III.2.2.3.1. Tolérance à l'acidité	46
III.2.2.3.2. Tolérance aux sels biliaires.....	47
III.2.2.3.3. Tolérance à 0,4 % de phénols.....	47
III.2.3. Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques.....	48
III.2.3.1. Pouvoir hémolytique	48
III.2.3.2. Mise en évidence de la gélatinase.....	48
III.2.3.3. Production de la DNase	48
III.2.3.4. Test de coagulase.....	49
III.2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques.....	49
III.2.4. Caractérisation des souches probiotiques	50
III.2.4.1. Identification phénotypique au stade genre	50
III.2.4.1.1. Examen macroscopique et microscopique	50
III.2.4.1.2. Caractérisation biochimique	51
III.2.4.1.2.1. Test de catalase	51

III.2.4.1.2.2. Production du CO ₂ à partir de glucose	51
III.2.4.1.2.3. Production de NH ₃ à partir de l'arginine	51
III.2.4.1.2.4. Dégradation de l'esculine	51
III.2.4.1.3. Caractérisation physiologique	51
III.2.4.1.3.1. Croissance à différentes températures	51
III.2.4.1.3.2. Croissance à différentes concentrations d'NaCl.....	52
III.2.4.1.3.3. Croissance aux pH 4,4 et 9,6	52
III.2.4.1.3.4. Thermorésistance.....	52
III.2.4.2. Identification moléculaire des souches probiotiques.....	52
III.2.4.2.1. Réactivation et centrifugation des cultures bactériennes.....	52
III.2.4.2.2. Amplification de l'ARNr 16S par PCR et électrophorèse sur le gel d'agarose	53
III.2.4.2.3. Purification des produits PCR	54
III.2.4.2.4. Séquençage du gène ARNr 16S	54
III.2.4.2.5. Construction de l'arbre phylogénétique	54
III.3. Résultats et discussion	55
III.3.1. Isolement des bactéries lactiques.....	55
III.3.2. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques	55
III.3.2.1. Activité antibactérienne des isolats lactiques contre les souches indicatrices	55
III.3.2.2. Propriétés adhésives	60
III.3.2.2.1. Hydrophobicité et auto-agrégation	60
III.3.2.2.2. Co-agrégation	62
III.3.2.3. Résistance à l'acidité et aux sels biliaires.....	65
III.3.2.4. Résistance à 0,4 % de phénols.....	67
III.3.3. Innocuité des souches sélectionnées.....	69
III.3.3.1. Activité hémolytique	69
III.3.3.2. Production de la gélatinase	69
III.3.3.3. Production de DNase	70
III.3.3.4. Test de coagulase.....	70
III.3.3.5. Sensibilité aux antibiotiques.....	71
III.3.2.4. ACP des propriétés probiotiques des souches lactiques.....	75
III.3.5. Caractérisation des souches probiotiques	79
III.3.5.1. Identification phénotypique au stade genre	79
III.3.5.2. Identification génotypique des souches probiotiques.....	82
IV.1. Introduction	86
IV.2. Matériel et Méthodes	86
IV.2.1. Propriétés nutritionnelles.....	86
IV.2.1.1. Utilisation du lactose	86
IV.2.1.2. Production de l'amylase	86
IV.2.1.3. Profil fermentaire	86

IV.2.2. Propriétés technologiques	87
IV.2.2.1. Production des dextrans.....	87
IV.2.2.2. Production de citratase	87
IV.2.2.3. Pouvoir aromatisant.....	87
IV.2.2.4. Activité protéolytique.....	88
IV.2.2.5. Activité Lipolytique.....	88
IV.2.2.6. Cinétique d'acidification	88
IV.3. Résultats et discussion	89
IV.3.1. Propriétés nutritionnelles.....	89
IV.3.1.1. Utilisation du lactose.....	89
IV.3.1.2. Activité amylolytique	89
IV.3.1.3. Profil fermentaire	90
IV.3.2. Propriétés technologiques	92
IV.3.2.1. Production des dextrans.....	92
IV.3.2.2. Production de citratase	92
IV.3.2.3. Pouvoir aromatisant.....	93
IV.3.2.4. Activité protéolytique.....	93
IV.3.2.5. Activité lipolytique.....	95
IV.3.2.6. Cinétique d'acidification	95
Conclusion.....	98

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Selon les statistiques de la FAO, la population mondiale des chameaux est d'environ 35 millions de têtes (FAOSTAT, 2020). En Algérie, le troupeau des chameaux est réparti sur 3 principales zones de reproduction : le sud-est, le sud-ouest et l'extrême sud avec respectivement 52 %, 18 % et 30 % de la population totale estimée à 345 000 têtes jusqu'à 2013 (Boussouar, 2017). Cet animal désertique contribue à la survie des millions de personnes dans les zones arides et semi-arides, principalement en fournissant du lait presque toute l'année (El-Agamy, 2006).

Le lait de chamelle est riche en vitamines, minéraux, protéines, carbohydrates et immunoglobulines. Il est connu pour ses effets positifs sur la santé et de nombreuses études se concentrent sur sa caractérisation. Ainsi, ces études conduisent à l'utilisation croissante du lait de chamelle pour des raisons thérapeutiques (Silanikove et *al.*, 2016).

Le lait et les produits laitiers contiennent de nombreux nutriments essentiels et sont caractérisés par une microflore lactique riche et diversifiée. Les LAB sont parmi les bactéries les plus utilisées dans les fermentations alimentaires grâce à la production d'une large gamme de métabolites, participant ainsi à l'amélioration du goût et de la texture des produits alimentaires fermentés (Mokoena, 2017 ; Ruiz Rodríguez et *al.*, 2019).

En raison de leurs bienfaits pour la santé, certaines LAB sont largement utilisées comme probiotiques comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Amrouche, 2005). En cas d'administration de ces bactéries probiotiques vivantes en quantité suffisante, elles améliorent la santé humaine ou animale.

Parmi les avantages exercés par les probiotiques sur la santé de l'hôte : la réduction de l'intolérance au lactose, des allergies, du cholestérol et de la pression artérielle, la prévention du cancer du côlon, etc. Tous ces effets bénéfiques se font spécialement grâce au contact direct entre les cellules, à la sécrétion de diverses molécules et/ou à l'alimentation microbienne croisée (Devi et *al.*, 2015 ; Gómez et *al.*, 2016 ; Mokoena, 2017).

Les probiotiques sont disponibles dans les aliments fermentés tels que le yaourt, ou comme compléments nutritionnels qui contiennent des bactéries vivantes pour la constitution du microbiote intestinal (Mokoena, 2017).

Afin d'identifier et de sélectionner les probiotiques potentiels, une série de tests *in vitro* ont été développés et appliqués. Tout d'abord, une souche probiotique doit être correctement identifiée à l'aide des méthodes phénotypiques et génotypiques. Elle doit être capable de survivre au pH acide de l'environnement stomacal et de tolérer l'effet nocif des sels biliaires et des sucs gastro-intestinaux. En outre, elle doit posséder la propriété de coloniser la paroi intestinale par l'adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines, réduisant ainsi l'attachement des microorganismes pathogènes aux surfaces et de les contrecarrer directement ou grâce aux substances antibactériennes produites par elles (FAO/WHO, 2002 ; Shokryazdan et *al.*, 2014 ; Ng et *al.*, 2015).

De plus, la souche probiotique sélectionnée doit être sûre, non pathogène ou toxigène et ne doit pas porter des gènes de résistance aux antibiotiques pouvant être transférés à d'autres bactéries, en particulier à celles pathogènes (Diana et *al.*, 2015).

Les produits probiotiques ont connu une croissance rapide dans les marchés alimentaires mondiaux en raison de la sensibilisation accrue des consommateurs à la santé et de leur demande d'aliments sains (Iyer et *al.*, 2011). Pour cela, un probiotique doit posséder des propriétés technologiques rendant possible son utilisation pour la production industrielle (Castex, 2009).

D'après la littérature, un nombre important de LAB sont isolées à partir de divers aliments fermentés dans différentes parties du monde et étudiées pour leur potentiel probiotique et leur capacité à produire des substances importantes sur le plan industriel.

Dans ce contexte, des bactéries lactiques sont isolées à partir du lait de chamelle fermenté qui a été collecté à partir différentes régions du sud-est Algérien. Après réalisation de plusieurs tests *in vitro*, les souches ayant des propriétés probiotiques sont sélectionnées.

Pour évaluer leur innocuité certains tests ont été appliqués. Ensuite, les souches probiotiques sont caractérisées phénotypiquement et génotypiquement et certaines de leurs propriétés technologiques ont été étudiées.

Malgré les vertus thérapeutiques du lait de chamelle cru, des études ont signalé la dangerosité de sa consommation à cet état et elles l'ont associé aux mauvaises conditions hygiéniques de manipulation. D'autre part, ce qui ressort de nos visites dans les endroits de pâturage des chameaux, c'est la fréquence croissante des patients surtout ceux cancéreux, qui consomment le lait directement après la traite de la chamelle. Pour cela, une partie de cette

étude s'intéresse à évaluer la qualité microbiologique du lait prélevé à partir des chamelles individuelles et sous des conditions hygiéniques strictes.

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Le lait de chamelle

Les chameaux soutiennent la survie des millions de personnes dans la région sèche d'Asie et d'Afrique. Leurs femelles peuvent produire une quantité importante de lait à partir d'une alimentation pauvre par rapport à toute autre espèce laitière (Park et Haenlein, 2006 ; Rahmeh et *al.*, 2019).

I.1.1. Composition chimique et valeur nutritionnelle

Le lait de chamelle a une couleur très blanche et peut être mousseux. Son goût est généralement sucré lorsque les chameaux sont nourris de fourrage vert, mais parfois salé. Les changements de goût sont causés par le type de fourrage brouté et la disponibilité en eau potable (Farah, 1993 ; Park et Haenlein, 2006).

La composition chimique du lait de chamelle s'est avérée moins stable que celle des autres espèces comme le lait de vache. Les variations observées dans la composition du lait de chamelle pourraient être attribuées à plusieurs facteurs tels que les procédures de mesure analytique, les emplacements géographiques, les conditions d'alimentation et les échantillons prélevés sur différentes races. En plus d'autres facteurs comme le stade de lactation, l'âge et le nombre de chamelons (Al haj et Al Kanhal, 2010).

✓ Eau

Un des facteurs importants qui affecte la composition du lait de chamelle est l'eau. La teneur du lait en eau est de 86% lorsque l'accès à l'eau potable est libre. En cas de restriction, elle sera augmentée à 91%. Cela pourrait être lié à une adaptation naturelle des chameaux afin de réhydrater leurs petits (Farah, 1993).

✓ Matière grasse

Une caractéristique principale du lait de chamelle par rapport aux autres laits est sa faible teneur en matières grasses et sa forte teneur en acides gras insaturés et à longue chaîne. Ceci peut avoir des effets bénéfiques sur les consommateurs présentant un risque de maladies cardiovasculaires. En outre, les globules gras du lait de chamelle sont plus petits que ceux de tous les ruminants et ne s'agrègent pas naturellement en raison de l'absence d'agglutinine. Ce qui augmente sa digestibilité dans le système gastro-intestinal (Jilo et Tegegne, 2016; Singh et *al.*, 2017; Rahmeh et *al.*, 2019).

✓ **Lactose**

Le lactose est le principal glucide du lait de la plupart des mammifères. Sa teneur est de 4,2 % qui est inférieure à celle du lait de vache (4,9 %). Il est facilement digéré par la lactase humaine et peut se substituer au lait de vache pour les enfants de plus de 2 ans (Singh et *al.*, 2017; Rahmeh et *al.*, 2019).

✓ **Protéines**

La teneur totale en protéines du lait de chamelle varie de 2,1 à 4,9 %. Elles se divisent en 2 groupes : les caséines et les protéines de lactosérum (Zibae et *al.*, 2015 ; Singh et *al.*, 2017).

Les caséines constituent la partie protéique majeure avec 4 fractions principales: α 1-CN, α 2-CN, β -CN, et κ -CN. La caséine α 1 constitue le facteur prédominant de l'allergie aux protéines du lait. Le lait de chamelle a une meilleure digestibilité et il induit moins de réactions allergiques chez les nourrissons car les α s-CN s'hydrolyse lentement que les β -CN (Jilo et Tegegne, 2016).

Les protéines de lactosérum constituent environ 20 à 25 % des protéines totales. Comme celui humain, le lait de chamelle ne contient pas de β -lactoglobulines. Alors que l' α -lactalbumine est prédominante dans le lait de chamelle. Il n'existe aucun rapport concernant les indicateurs d'allergie que possèdent ces laits (Singh et *al.*, 2017 ; Rahmeh et *al.*, 2019).

D'autres protéines de lactosérum du lait de chamelle jouent un rôle immunitaire crucial, tels que : PGRP, les immunoglobulines, lysozymes, lactoferrine (Farah, 1993 ; Jilo et Tegegne, 2016).

✓ **Minéraux**

Les sels minéraux du lait de chamelle sont principalement des chlorures, des phosphates et des citrates de Na, Ca et Mg. Bien que les sels constituent moins de 1 % du lait, ils influencent l'état physique et la stabilité des protéines du lait, en particulier les caséinates (Farah, 1993). De plus, le lait de chamelle est plus riche en Zn, Fe, Cu et Mn que le lait de vache (Singh et *al.*, 2017).

✓ **Vitamines**

Parmi les vitamines hydrosolubles, le lait de chamelle est riche en niacine et en vitamine C. Sa richesse en vitamines, notamment la vitamine C (24-52 mg/kg), qui est 3 à 5 fois et 1,5 fois plus élevée que la vitamine C bovine et le lait humain, respectivement, donne à ce lait une grande importance du point de vue nutritionnel dans les zones arides où les aliments verts ne sont pas facilement accessibles (Singh et *al.*, 2017 ; Rahmeh et *al.*, 2019).

Le lait de chamelle contient moins de vitamines A et E, de thiamine, de riboflavine et des acides folique et pantothénique que celui de la vache. Par ailleurs, les teneurs en pyridoxine et en vitamine B12 sont à peu près les mêmes (Farah, 1993, Singh *et al.*, 2017).

I.1.2. Microbiote du lait de chamelle

Le lait contient de l'eau en abondance, des nutriments et un pH presque neutre, ce qui favorise la croissance de nombreux microorganismes. La nature et l'abondance de la charge microbienne sont fortement influencées par de nombreux paramètres, tels que le milieu environnant et l'état de santé des chameaux (Ledenbach et Marshall, 2009 ; Rahmeh *et al.*, 2019).

Ces microorganismes peuvent être regroupés en 2 catégories principales :

- Microorganismes pathogènes et de détérioration.
- Microorganismes probiotiques et/ou d'intérêt technologique.

I.1.2.1. Microorganismes pathogènes et de détérioration

Des enquêtes montrent que le lait de chamelle cru est fortement contaminé lorsque les chameaux sont traités dans des conditions nomades sans hygiène adéquate (Wernery, 2007).

La première contamination du lait peut avoir lieu au moment de la traite, lors du passage dans le canal du trayon, par le matériel ou le personnel de traite. Une contamination ultérieure est possible pendant le transport et le stockage du lait (Eberlein, 2007).

L'altération du lait est causée par les microorganismes saprophytes qui peuvent avoir un impact négatif sur sa qualité et sur sa durée de conservation. Les agents pathogènes responsables des mammites, principalement *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae*, sont préoccupants pour la santé publique, car certains d'entre eux peuvent produire des toxines ou provoquer des infections graves chez l'homme (Younan, 2004 ; Eberlein, 2007).

En outre, la contamination du lait cru par des bactéries pathogènes provenant d'une source extérieure à la mamelle peut être causée par des souches de salmonelles, responsables des gastroentérites (Omer et Eltinay, 2008).

De même, l'occurrence de différentes espèces fongiques pathogènes dans le lait de chamelle cru avec présence de hautes concentrations d'aflatoxines a été rapportée par plusieurs auteurs (Rahmeh *et al.*, 2019).

I.1.2.2. Microorganismes probiotiques et/ou d'intérêt technologique

Il est bien connu que la microflore lactique spécifique du lait a un impact direct sur le développement de la texture et la saveur du produit laitier fini. Elle participe aussi à leurs propriétés antimicrobiennes grâce à la production de plusieurs composés tels que les bactériocines et les acides organiques (Tab.1) (Rahmeh et al., 2019).

En général, la microflore du lait de chamelle cru et leurs produits fermentés est constituée d'un mélange de différentes espèces de LAB, telles que: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* et *Streptococcus thermophilus* (Jans et al., 2012).

Tableau 1. LAB productrices de bactériocines isolées à partir du lait de chamelle et leurs produits fermentés (Rahmeh et al., 2019).

Zones géographiques	Lait et sous produits	Genres détectés	Bactériocines
Kuwait	Lait de chamelle cru	<i>Enterococcus faecium</i>	Entérocinés A, B et P
Algérie	Lait de chamelle cru	<i>Enterococcus faecium</i>	Entérocinés L50 A et L50B
	Lait de chamelle cru	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Leucocine B
	Beurre produit à partir du lait de chamelle	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bactériocines-like
Chine	Shubat	<i>Lactobacillus casei</i>	Caséicine TN-2
Jordanie	Lait de chamelle cru et fermenté	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	Bactériocines -like
Arabie saoudite	Lait de chamelle cru	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidophilucine AA105

I.1.3. Propriétés bénéfiques du lait de chamelle pour la santé

Actuellement, la valeur du lait de chamelle a augmenté dans le monde entier en raison de sa grande valeur thérapeutique pour la santé humaine.

I.1.3.1. Activités antimicrobienne et antivirale

Le lait de chamelle est enrichi de diverses protéines protectrices comme le lysozyme, la lactoferrine, la lactoperoxydase, la PGRP, les IgG et les IgA qui exercent des activités : antibactérienne, antivirale, antifongique et antiparasitaire. De plus, elles possèdent des propriétés immunologiques, des activités stimulante de la croissance et anti-tumorale (Jilo et Tegegne, 2016).

Ces protéines sont bactériostatiques et parfois bactéricides sur les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*) (Matofari et al., 2013 ; Singh et al., 2017).

L'action inhibitrice du lait de chamelle contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli* pourrait être attribuée à la présence de lactoperoxydase, du peroxyde d'hydrogène et de lysozyme respectivement. La lactoferrine inhibe la croissance de *S. typhimurium* en liant le fer et en le rendant indisponible pour sa croissance (Al haj et Al Kanhal, 2010 ; Singh et al., 2017).

Le lait de chamelle a des propriétés médicinales pour traiter la tuberculose. D'après une étude faite en Inde, une amélioration significative des symptômes observés suite à la consommation du lait de chamelle par des patients atteints de tuberculose multirésistante aux antibiotiques (Jilo et Tegegne, 2016 ; Kaskous, 2016).

Les rotavirus sont responsables des gastroentérites non bactériennes les plus fréquentes chez les nourrissons et les veaux dans la plupart des régions du monde (Park et Haenlein, 2006). Il a été démontré que le lait cru de chamelle contient des anticorps anti-rotavirus et il est utilisé comme remède pour traiter les diarrhées (Singh et al., 2017).

Le virus de l'hépatite C (VHC) se propage dans le monde entier et aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. La plupart des personnes infectées sont incapables d'éliminer le virus, ce qui entraîne une infection persistante dans environ 80 % des cas. Les patients infectés de façon chronique développent souvent une maladie hépatique progressive, une cirrhose, une insuffisance hépatique et un carcinome hépatocellulaire (CHC) (El-Fakharany et al., 2008 ; Kaskous, 2016).

El-Fakharany et *al.* (2008) ont démontré que la lactoferrine de lait de chamelle purifiée de 80 KDa empêche l'entrée et la réplication du VHC (génotype 4a) dans l'hépG2 (hépatome humain) ainsi que dans les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Le lait de chamelle inhibe aussi d'autres virus comme : CMV (Cytomégalovirus), virus herpès simplex-1 et virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Abrahaley et Leta, 2018).

I.1.3.2. Activité anticancéreuse

Il existe un certain nombre de tumeurs qui peuvent être traitées avec du lait de chamelle. Ainsi, la présence des anticorps très actifs, capables de se fixer aux tumeurs, tuent les cellules tumorales sans endommager les tissus sains. Une étude de Korashy et *al.* (2012) a montré que le lait de chamelle inhibe de manière significative la prolifération des cellules HepG2 (hépatome humain) et MCF7 (sein humain) par des mécanismes épigénétiques (Jilo et Tegegne, 2016 ; Kaskous, 2016 ; Abrahaley et Leta, 2018).

De plus, la protéine PGRP, qui est présente uniquement dans le lait de chameles peut contrôler des métastases cancéreuses. La lactoferrine du lait de chamelle peut inhiber la prolifération de la lignée cellulaire de cancer du côlon, HCT-116 *in vitro* et réparer les dommages de l'ADN (Kaskous, 2016 ; Singh et *al.* 2017).

I.1.3.3. Amélioration de la digestion du lactose

Comme mentionné précédemment, le lait de chamelle est aisément digestible par l'homme. Des études ont démontré une excellente tolérance chez les personnes intolérantes au lactose soit 23 sur 25 patients après consommation du lait de chamelle (Kaskous, 2016 ; Abrahaley et Leta, 2018). Cela peut être attribué à une rapide élimination du lactose et à son faible taux. Comme elle peut être liée à la forme L. lactate qui est abondante dans le lait de chamelle (Al-Juboori et *al.*, 2013; Kaskous, 2016).

I.1.3.4. Traitement de l'autisme

L'autisme est un trouble grave du développement neurologique causé par une décomposition de la caséine en un opioïde puissant, la casomorphine. Cette dernière peut provoquer des dommages des symptômes cognitifs et comportementaux de l'autisme (Zibae et *al.*, 2015 ; Jilo et Tegegne, 2016 ; Abrahaley et Leta, 2018).

Il a été démontré que le lait de chamelle a un effet thérapeutique dans la maladie de l'autisme car contrairement au lait de vache, il ne contient pas les 2 caséines qui provoquent les

symptômes de l'autisme (Kaskous, 2016). Une consommation régulière du lait de chamelle par les enfants autistes entraîne une amélioration des capacités motrices, du langage, de la cognition, de la coordination des articulations, de la santé de la peau et de leur alimentation (Jilo et Tegegne, 2016 ; Abrhaley et Leta, 2018).

I.1.3.5. Effet hypoglycémiant

Le lait de chamelle contient de hauts niveaux (52 micro unités/mL) d'insuline ou des substances semblables à l'insuline comme la demi-cystine (Al haj et Al Kanhal, 2010 ; Al-Juboori et *al.*, 2013).

Sous l'effet de l'acidité de l'estomac, l'insuline se retrouve intacte pour être absorbé dans l'intestin, car contrairement au lait des autres mammifères, le lait de chamelle ne caille pas (Konuspayeva et *al.*, 2004). Il semble que la consommation régulière du lait de chamelle exerce un effet bénéfique dans le traitement des patients atteints de diabète de type 1 (Konuspayeva et *al.*, 2004 ; Abrhaley et Leta, 2018).

I.2. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la fermentation et la biopréservation des aliments. Elles ont, également, toujours montré des effets bénéfiques sur l'équilibre de la flore intestinale et la santé du bien-être en général.

I.2.1. Description et distribution

Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulantes, micro aérophiles ou anaérobies, catalase négative, oxydase négative, acidotolérantes, non motiles, de forme coccoïde ou bâtonnet qui produisent l'acide lactique comme un produit principal final après fermentation de glucose.

À l'exception de quelques espèces, les membres des LAB sont des organismes non pathogènes et considérés comme « GRAS » (Reddy *et al.*, 2008 ; Papadimitriou *et al.*, 2016).

L'attention portée aux effets précieux des LAB remonte au microbiologiste russe, Elie Metchnikoff, qui a démontré que la longévité accrue des Balkans pourrait être due à leur habitude d'ingérer des produits laitiers fermentés. Il a présumé que les personnes qui abritent les LAB dans leur TGI préviennent les effets nocifs des microorganismes putréfiants.

Depuis des milliers d'années, diverses espèces des LAB sont utilisées pour la production du lait fermenté dans de nombreux pays. Aujourd'hui, elles sont devenues importantes sur le plan industriel et utilisées pour la production d'une large gamme d'aliments fermentés tels que le yaourt, le fromage et le beurre. Les LAB interviennent également dans de nombreux procédés de transformation et de conservation des aliments (Reddy *et al.*, 2008 ; Evivie *et al.*, 2017).

Les LAB sont généralement associées à des matières premières végétales et animales et aux produits alimentaires fermentés correspondants, y compris les produits laitiers, viande, légumes et céréales, où la fermentation peut avoir lieu. Certaines espèces sont également présentes dans les voies respiratoires, intestinales et génitales des humains et des animaux (Reddy *et al.*, 2008 ; Giraffa, 2014).

Ainsi, la majorité des espèces de *Lactobacillus* sont isolées à partir du TGI des humains et des animaux. Un nombre important provient des légumes et de leurs produits de fermentation.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont principalement isolées à partir des viandes réfrigérées ou des sources cliniques, bien qu'elles puissent également être obtenues à partir du matériel végétal, des produits laitiers fermentés et des vins.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont associées à l'altération des boissons fermentées, en particulier les bières. Bien que les espèces de *Lactococcus* aient été isolées à partir du matériel végétal, elles sont plus abondantes dans les produits laitiers tels que le lait fermenté.

Il est à noter que la capacité à coloniser de tels habitats est une conséquence directe de la grande versatilité métabolique de ce groupe de bactéries (Liu et al., 2014 ; Mokoena, 2017).

I.2.2. Classification

La classification des bactéries lactiques en différents genres est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit et la tolérance aux fortes concentrations en sel et aux acides ou bases. Des marqueurs chimiotaxonomiques tels que la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire sont également utilisés dans la classification (Axelsson, 2004).

D'autres caractéristiques phénotypique et biochimique sont utilisées pour identifier les espèces des LAB, il s'agit de : la gamme des carbohydrates fermentés, l'hydrolyse de l'arginine, la production d'acétoïne (test de Voges-Proskauer), la tolérance aux sels biliaires, le type d'hémolyse, la production de polysaccharides extracellulaires, les besoins en facteurs de croissance, la présence de certaines enzymes (par exemple, β -galactosidase et β -glucuronidase), les caractéristiques de croissance dans le lait et le typage sérologique (Axelsson, 2004).

Au cours des années 1990, les progrès des techniques moléculaires ont permis une description plus poussée des LAB. Ces bactéries ont généralement une faible teneur en GC (<50 mol %), tandis que certains lactobacilles ont été rapportés comme atteignant jusqu'à 57 mol % (Papadimitriou et al., 2016).

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales* qui comprend 6 familles : *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Aerococcaceae*. Ces familles comprennent 38 genres dont 10 considérés comme les plus associés aux aliments: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* et *Weissella* (Vandamme et al., 2014 ; Papadimitriou et al., 2016).

Actuellement, il existe plus de 400 espèces lactiques avec plus d'une centaine chez *Lactobacillus* qui est considéré comme le genre le plus large (Papadimitriou et al., 2016, Mokoena, 2017) (Tab.2).

I.2.3. Métabolisme

Les LAB sont des hétérotrophes avec des exigences nutritionnelles complexes en raison de leurs capacités biosynthétiques limitées surtout en acides aminés et en vitamines. De ce fait, elles ne sont généralement abondantes que dans les communautés riches en nutriments. Le pH optimum de croissance des LAB est compris entre 5,5–5,8 (Mokoena, 2017).

I.2.3.1. Fermentation des carbohydrates

En se basant sur les voies métaboliques utilisées pour fermenter le glucose et leur capacité de métaboliser les pentoses, les genres lactiques sont différenciés en 3 groupes (Endo et Dicks, 2014):

- **Homofermentaires obligatoires** : selon la classification de Kandler et Weiss (1986), certaines espèces du genre *Lactobacillus*, constituant le groupe I des lactobacilli, sont incluses dans ce groupe. Elles fermentent le glucose en acide lactique exclusivement *via* la glycolyse et ne fermentent pas les pentoses.
- **Hétérofermentaires facultatifs** : ce groupe est constitué de : *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactovum*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* et le groupe II de *Lactobacillus* spp. Ces bactéries produisent seulement l'acide lactique après fermentation de glucose par la glycolyse. Les pentoses sont fermentés par la voie de phosphocétolase.
- **Hétérofermentaires obligatoires** : Les membres des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus* et *Lactobacillus* spp. du groupe III, fermentent le glucose, les pentoses et les composés liés *via* la voie de phosphocétolase.

Tableau 2. Présentation des espèces des bactéries lactiques^{a,b} (Vandamme et *al.*, 2014).

Familles	Genres	Espèce type	Nombre des espèces
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	<i>Ab. defectiva</i>	1
	<i>Aerococcus</i>	<i>Ae. viridans</i>	7
	<i>Dolosicoccus</i>	<i>Dc. paucivorans</i>	1
	<i>Eremococcus</i>	<i>Ere. coleocola</i>	1
	<i>Facklamia</i>	<i>F. hominis</i>	6
	<i>Globicatella</i>	<i>Glo. sanguinis</i>	2
	<i>Ignavigranum</i>	<i>Ig. ruoffiae</i>	1
Carnobacteriaceae	<i>Alkalibacterium</i>	<i>Alk. olivapovliticus</i>	9
	<i>Allofustis</i>	<i>Af. seminis</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	<i>Ai. otitis</i>	1
	<i>Atopobacter</i>	<i>Ap. phocae</i>	1
	<i>Atopococcus</i>	<i>Ac. tabaci</i>	1
	<i>Atopostipes</i>	<i>At. suicloacalis</i>	1
	<i>Bavariiococcus</i>	<i>B. seileri</i>	1
	<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i>	10
	<i>Desemzia</i>	<i>D. incerta</i>	1
	<i>Dolosigranulum</i>	<i>Dg. pigrum</i>	1
	<i>Granulicatella</i>	<i>Gra. adiacens</i>	3
	<i>Isobaculum</i>	<i>Is. melis</i>	1
	<i>Lacticigenium</i>	<i>Lg. naphthae</i>	1
	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M. psychrotolerans</i>	2
	<i>Trichococcus</i> (incl. <i>Lactosphaera</i>)	<i>Tr. flocculiformis</i>	5
<i>Catelicoccus</i>	<i>Cat. marimammalium</i>	1	
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	43
	<i>Melissococcus</i>	<i>Me. plutonius</i>	1
	<i>Pilibacter</i>	<i>Pi. termitis</i>	1
	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Tet. halophilus</i>	5
	<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i>	8
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	151
	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Pl. selangorensis</i>	1
	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped. damnosus</i>	11
Leuconostocaceae	<i>Fructobacillus</i>	<i>Fru. fructosus</i>	5
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	13
	<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>	2
	<i>Weissella</i>	<i>W. viridescens</i>	15
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>	7
	<i>Lactovum</i>	<i>Lv. miscens</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	78
D'autres 'LAB'	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. bifidum</i>	41

^a À l'exclusion des espèces qui sont reclassées de façon générique et des espèces reclassées dans le rang des sous-espèces.

^b Les espèces considérées comme des synonymes hétérotypiques ont été comptées une fois.

I.2.3.2. Fermentation des acides organiques

La fermentation des acides organiques joue un rôle important dans le métabolisme énergétique de plusieurs LAB hétérofermentaires.

Le métabolisme du malate est important pendant la fermentation secondaire du vin. De nombreuses LAB utilisent cette fermentation pour produire du L-lactate et du CO₂ comme produits finaux (Endo et Dicks, 2014).

Plusieurs espèces de LAB citant par exemple, *Lc. diacetylactis* et *Leuconostoc* spp. ont la capacité de métaboliser le citrate, un processus qui nécessite son transport à l'intérieur de la cellule, sa conversion en oxaloacétate qui est ensuite décarboxylé en CO₂ et en pyruvate.

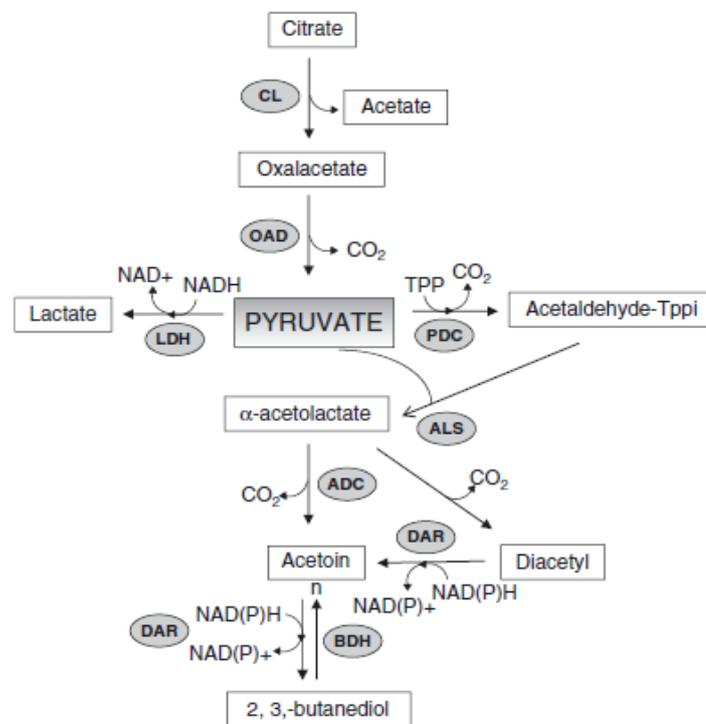


Figure 1. Métabolisme des citrates chez les espèces des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* (Mayo et al., 2010).

CL, citrate lyase ; OAD, oxaloacétate décarboxylase ; LDH, lactate déshydrogénase ; PDC, pyruvate décarboxylase ; ALS, α - acétolactate synthase ; ADC, α -acétolactate décarboxylase ; DAR, diacétyl acétoïne réductase ; BDH, 2,3 - butanediol déshydrogénase ; Tppi, thiamine pyrophosphate.

Le pyruvate est également dirigé vers d'autres voies métaboliques menant à une variété de produits finaux tels que : le diacétyle, l'acétoïne et le butanediol, qui ont des propriétés aromatiques conférant l'arôme typique à de nombreux produits laitiers (Mayo et *al.*, 2010 ; von Wright, 2019).

De nombreuses LAB peuvent tirer de l'énergie de l'arginine importée par la voie de l'arginine déiminase conduisant à la formation d'ATP et libération de NH₃. Ce métabolisme a été trouvé dans diverses souches de LAB hétérofermentaires et il est important dans la panification (Endo et Dicks, 2014).

1.2.3.3. Fermentation des disaccharides

Certaines LAB métabolisent les disaccharides tels que : le cellobiose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le saccharose, etc. Ces sucres sont transportés à travers la membrane cellulaire, soit sous forme de sucres libres, soit phosphorylés. Ils sont ensuite clivés en sucres simples puis métabolisés *via* des voies appropriées (Endo et Dicks, 2014).

1.2.3.4. Protéolyse et lipolyse

De nombreuses LAB sont auxotrophes pour un nombre variable d'acides aminés. Par conséquent, elles dépendent d'un système protéolytique actif pour satisfaire leurs besoins en acides aminés. Les composants protéolytiques des LAB sont parmi les mieux caractérisés, non seulement en raison de leur impact sur la physiologie des LAB, mais aussi en raison de leur implication dans le développement de la texture et de la flore des produits laitiers.

Les composants structurels des systèmes protéolytiques peuvent être divisés en 3 groupes en se basant sur leur fonction :

- 1- Protéinases :** les protéinases subtilisine-like serine associée à la paroi cellulaire (PrtP) dégradent la caséine en oligopeptides de taille variable.
- 2- Système de transport :** il assure la translocation des peptides à travers la membrane cytoplasmique. Les gros peptides (4-18 acides aminés) sont transportés par un système de transport oligopeptidique (Opp). Tandis que des systèmes de transport de di- et tripeptides existent pour les plus petits peptides.
- 3- Peptidases :** à l'intérieur de la cellule, les peptides sont dégradés en acides aminés par des peptidases intracellulaires. Ces derniers seront encore dégradés par des voies

métaboliques dépendantes de la souche pour générer les composés volatils réels responsables du profil aromatique des produits fermentés (Mayo *et al.*, 2010 ; von Wright et Axelsson, 2019).

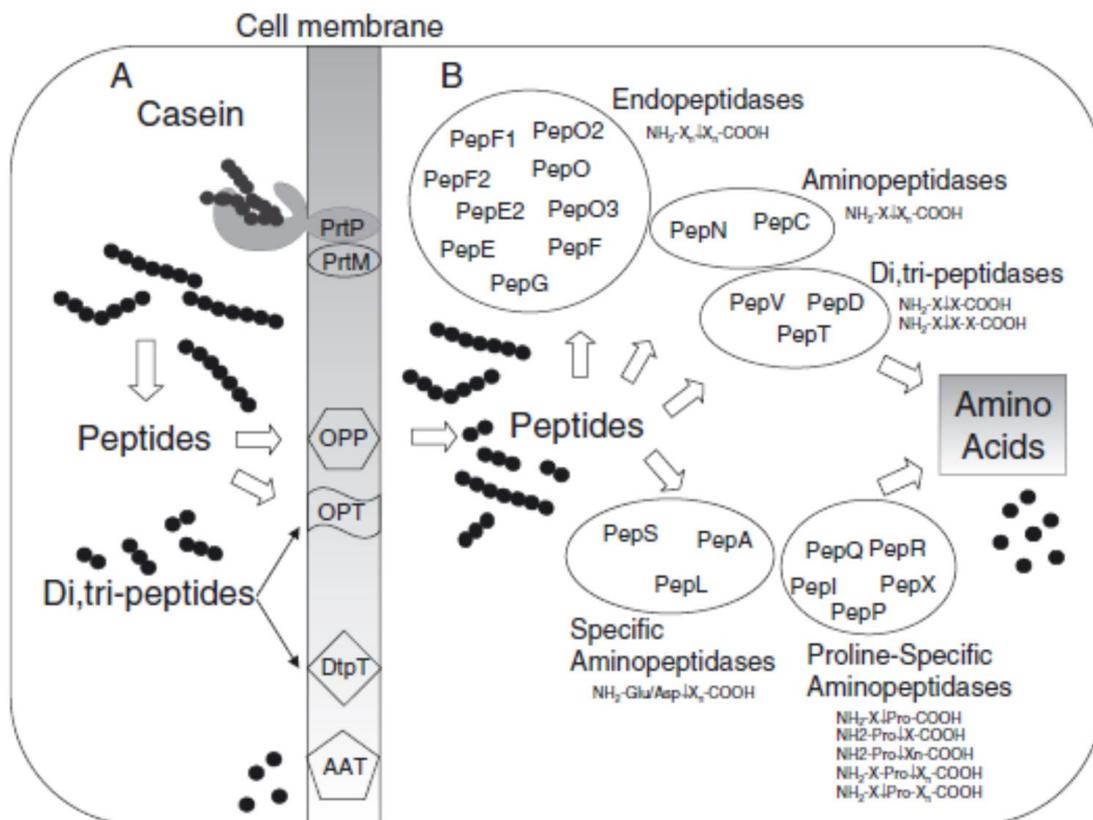


Figure 2. Diagramme des systèmes protéolytiques chez LAB (Mayo *et al.*, 2010).

L'emplacement et les cibles des différents composants sont indiqués. Le pentagone au bas de la membrane cellulaire marqué AAT fait référence aux différents types (environ 14) de transporteurs d'acides aminés. L'action et la spécificité des peptidases sur un peptide sont indiquées dans le schéma par des flèches.

La lipolyse est importante pour le développement de la saveur des produits laitiers, en particulier lors de l'affinage des fromages. Plusieurs LAB associées aux produits laitiers, y compris : *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*, ont été rapportées comme ayant une activité lipolytique.

La lipolyse se produit dans les fromages généralement par l'intermédiaire des systèmes estérase/lipase des LAB (Endo et Dicks, 2014).

I.2.4. Applications des bactéries lactiques dans les fermentations alimentaires

Jusqu'à présent, les cultures lactiques sont les plus largement employées comme starters dans les diverses fermentations alimentaires, comme les produits laitiers, boissons, légumes, haricots, viandes, poissons, etc. (Chen et Hang, 2019).

Elles améliorent les propriétés des aliments fermentés par renforcement de leurs valeurs nutritionnelles, technologiques et organoleptiques.

Ainsi, les valeurs nutritives des produits fermentés sont supérieures à celles des aliments crus en raison des acides organiques et des vitamines sécrétés par les cultures starters.

Les LAB influencent également les propriétés sensorielles d'un produit, y compris le développement du goût. Les composés aromatiques sont formés par divers processus, tels que la conversion du lactose et du citrate (glycolyse et le métabolisme du pyruvate), des lipides (lipolyse) et des protéines (protéolyse) (Giraffa, 2014).

De plus, les EPS produits par LAB contribuent à la qualité du lait fermenté, en particulier à sa texture, sa saveur et sa viscosité. Ces molécules peuvent maintenir une certaine onctuosité du lait fermenté et un bon goût tout en réduisant l'utilisation des additifs alimentaires (Chun-lei et *al.*, 2014).

Les LAB convertissent le lactose principalement en acide lactique, jouant un rôle fonctionnel important dans la fermentation de nombreux produits, notamment ceux laitiers avec une texture désirable et un corps caractéristique. Elles contribuent également à la conservation des aliments fermentés en abaissant le pH à un tel niveau que de nombreux autres microorganismes d'altération ne peuvent pas se développer (Collins et *al.*, 2019).

En outre, les cultures lactiques starters peuvent sécréter des agents de conservation tels que les bactériocines, qui peuvent préserver et augmenter la durée de conservation des produits de fermentation et de leur sécurité. Cependant, à travers certaines voies métaboliques des LAB, elles peuvent conduire à la détérioration des aliments (Ameen et Caruso, 2017 ; Chen et Hang, 2019).

Les souches LAB habituellement utilisées dans les divers aliments fermentés sont montrées dans le Tab.3

Tableau 3. Les souches lactiques utilisées dans les différents aliments fermentés (Chen et Hang, 2019).

Matériel	Aliments	LAB
Produits laitiers	Yaourt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
	Yaourt probiotique	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
	Kéfir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i>
	Beurre et babeurre	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
	Fromages à pâte dure non poreux	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Légumes	Choucroute	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
	Cornichons	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i>
	Olives Fermentés	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
	Légumes fermentés	<i>Lb. fermentum</i>
	Jus	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. xylosum</i> , <i>Lb. sakei</i>
	Olives	<i>Lb. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosum</i>
Grains	Pâtes fermentées	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i>
Viandes	Saucisse fermenté (EU)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
	Saucisse fermenté (US)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Poissons		<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i>

I.2.5. Bactéries lactiques avec des propriétés favorables à la santé

En plus des fonctions importantes assurées par les bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire, elles constituent le groupe le plus réputé parmi les probiotiques.

I.2.5.1. Le concept « probiotique »

Ce concept a été l'épicentre d'études intensives au cours de ces dernières décennies (Paramithiotis et *al.*, 2017). Le terme "**probiotique**" est dérivé du grec qui signifie littéralement pour la vie. Sa première définition a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965 comme étant : "Les substances sécrétées par un microorganisme qui stimulent un autre microorganisme". Toutefois, il a été redéfini à travers des années, à mesure que les connaissances scientifiques et la compréhension de la relation entre la santé intestinale et le bien-être général ont été établies. En 2002, les experts de la FAO/WHO ont adopté une définition des probiotiques en décidant qu'il s'agissait des "microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte" (Lee, 2009a ; Zielińska et Kolozyn-Krajewska, 2018).

La plupart des aliments probiotiques contiennent les espèces des genres *Lactobacillus*, (*Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*), et/ou *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum*, *B. lactis*).

Certaines espèces du genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* var. *toyoi*) et la levure *Saccharomyces boulardii* sont également utilisés comme probiotiques, mais cette dernière est administrée sous forme de capsule ou de poudre plutôt qu'un inoculum dans les aliments.

Les entérocoques (*E. faecium* et *E. faecalis*) sont peu employés comme probiotiques car leurs espèces sont devenues des agents pathogènes opportunistes spécialement dans les hôpitaux causant des infections nosocomiales telles que l'endocardite et la bactériémie, ainsi que des infections intra-abdominales, urinaires et celles du système nerveux central.

Certaines espèces et genres peuvent contenir des déterminants de résistance aux antibiotiques transmissibles comme les souches d'*Enterococcus* résistantes à la vancomycine et les *Bacilli* comme *B. cereus*, capables de produire des entérotoxines et une toxine émétique (Anadón et *al.*, 2016).

Les microorganismes utilisés comme probiotiques sont représentés dans le Tab. 4

Tableau 4. Les microorganismes probiotiques (Konuray et Erginkaya, 2017).

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. cellebiosus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. cereus</i>
<i>Pediococcus</i> spp.	<i>P. cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. diacetilactis</i>
<i>Bacteriodes</i> spp.	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>P. shermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>L. mesenteroides</i>
Moisissures	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Candida torulopsis</i>

Le terme "**postbiotique**" est également apparu. Il est utilisé pour désigner des produits bactériens non viables ou les sous-produits métaboliques élaborés par des microorganismes probiotiques ayant une activité biologique chez l'hôte. En général, les postbiotiques comprennent les métabolites bactériens, les sous-produits, tels que les bactériocines, les acides organiques, l'éthanol, le diacétyl, l'acétaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène (Zielińska et Kolozyn-Krajewska, 2018).

Les « **paraprobiotiques** » ou probiotiques inactivés, désignent les microorganismes non viables qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent des avantages aux consommateurs. L'inactivation des cellules bactériennes peut être obtenue par des moyens physiques (perturbation mécanique, traitement thermique, irradiation UV, congélation, séchage, ou sonication) ou chimiques (désactivation acide), qui sont capables d'affecter les structures cellulaires microbiennes ou leurs fonctions physiologiques. Les paraprobiotiques conservent leur activité immunomodulatrice au-delà de leur viabilité cellulaire qui semble être associés aux composants de la structure des cellules mortes, principalement les constituants de la paroi cellulaire.

Les cellules probiotiques non viables présentent des avantages par rapport aux probiotiques vivants : le plus important est la réduction du risque de translocation microbienne, pouvant entraîner une infection ou une augmentation des réponses inflammatoires chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. En plus d'être plus sûr, les paraprobiotiques offrent plus de produits stables avec une durée de conservation plus longue que les probiotiques (Rossoni et *al.*, 2020).

La notion « **prébiotique** » est beaucoup plus récente. Elle a été introduite pour la première fois par Gibson et Roberfroid (1995) comme "ingrédients alimentaires non digestibles qui ont un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité d'espèces bactériennes déjà présentes dans le côlon, et d'améliorer ainsi sa santé". Comme les probiotiques, la définition originale a été fréquemment modifiée, mais jusqu'à présent, aucun consensus n'a été atteint (Zoumpoulou et *al.*, 2018).

Les substances reconnues pour leur propension à influencer la santé gastro-intestinale comprennent certaines substances non digestibles : les oligosaccharides non digestibles (OND), les fibres solubles fermentescibles et les oligosaccharides du lait humain. Les OND sont des glucides de faible poids moléculaire, intermédiaires entre les sucres simples et les polysaccharides tels que les fructooligosaccharides et les galactooligosaccharides (Rossoni et *al.*, 2020).

Les prébiotiques améliorent en général l'activité des *Lactobacillus* spp. et des *Bifidobacterium* spp. mais ils peuvent également être métabolisés par d'autres bactéries bénéfiques, notamment *Roseburia* spp., *Eubacterium* spp. ou *Faecalibacterium* spp. (Rossoni et *al.*, 2020).

La présence des prébiotiques (inuline ou oligofructose) dans l'alimentation peut entraîner de nombreux avantages pour la santé, tels que ; la stimulation du système immunologique, augmentation de l'absorbance du calcium, le maintien de la valeur du pH intestinal, la réduction de taux des LDL dans le sang, etc.

Il existe un potentiel évident d'utiliser les prébiotiques et les probiotiques ensemble d'une manière complémentaire et synergique. Par conséquent, les aliments qui les contiennent à la fois sont appelés **symbiotiques** (Critienden et Playne, 2009).

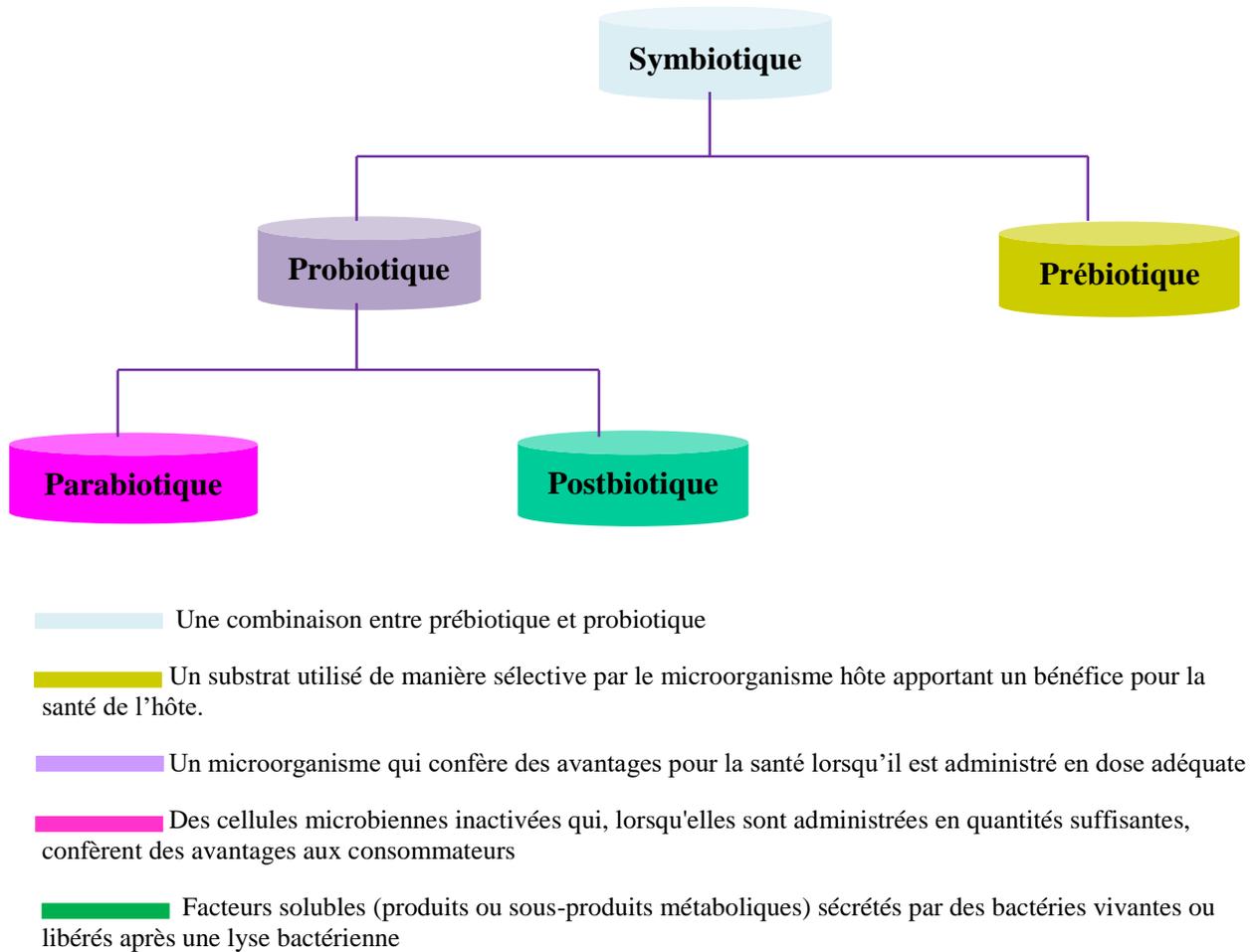


Figure 3. Représentation schématique de la terminologie relative aux probiotiques (Rossoni et al., 2020).

I.2.5.2. Sources des probiotiques

La source conventionnelle de probiotiques à usage humain, recommandée par la FAO/WHO, est le TGI. De nombreuses souches probiotiques ont été isolées de l'intestin humain, telles que : *Lb. salivarius* subsp. *salicinius* et *Lb. acidophilus*, ainsi qu'à partir des matières fécales humaines, telles que *B. longum* et *Lb. acidophilus*, et moins fréquemment l'estomac humain, comme : *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri*, *Lb. vaginalis*, *Lb. reuteri* et *Lb. salivarius* (Zielińska et Kolozyn-Krajewska, 2018).

Les probiotiques peuvent également provenir des sources non conventionnelles, comme le TGI d'un animal, le lait maternel humain, l'air ou le sol et les aliments (fermentés et non fermentés). Ces derniers constituent la source la plus courante (Yadav et Shukla, 2017 ; Zielińska et Kolozyn-Krajewska, 2018).

Les principaux vecteurs alimentaires des probiotiques sont les yaourts et les laits fermentés. Ils fournissent un pH de l'environnement dans lequel la bactérie probiotique doit survivre. Cependant, de nombreuses études montrent que les souches probiotiques sont trouvées également dans les substrats fermentés non laitiers comme : les céréales, les légumineuses, les choux, les légumes, etc. (Anandharaj et *al.*, 2014).

Outre les aliments, les probiotiques peuvent également être disponibles sous forme de liquide, de poudre, de gel, des granulés, des pâtes, des capsules, des sachets, des médicaments et des compléments alimentaires. Toutes ces formes de produits contiennent un grand nombre de bactéries qui restent dans un état stable du fabricant aux consommateurs (Yadav et Shukla, 2017).

Actuellement, une variété des produits fabriqués par plusieurs entreprises existe sur le marché, utilisant différentes souches de probiotiques, la question commune est : comment fonctionnent les probiotiques ?

I.2.5.3. Mécanismes d'action

Les probiotiques exercent de nombreux et divers effets sur l'hôte dont les principaux mécanismes d'action incluent : augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale et inhibition concomitante de l'adhésion des pathogènes, exclusion compétitive des microorganismes pathogènes, production des substances antimicrobiennes, amélioration de la barrière épithéliale et modulation du système immunitaire (Fig. 4) (Bermudez-Brito et *al.*, 2012).

La colonisation du TGI par les probiotiques implique, en premier lieu, leur adhérence à des récepteurs cellulaires *in situ* permettant la compétition pour les sites d'adhésion et les nutriments accessibles aux bactéries pathogènes (Pintado et *al.*, 2014b).

Pendant leur colonisation et au cours de leur croissance et de leur métabolisme, les probiotiques libèrent des substances antimicrobiennes, notamment les bactériocines et les acides organiques (lactique et acétique). Ces acides créent un environnement défavorable pour la multiplication des microorganismes pathogènes suite à une diminution du pH local. Certaines substances antimicrobiennes produites par les probiotiques ont une large activité contre les champignons, les bactéries pathogènes et les virus, empêchant ainsi leur établissement dans le TGI.

Les probiotiques améliorent aussi la barrière épithéliale, un mécanisme de défense majeur utilisé pour maintenir l'intégrité épithéliale et protéger l'organisme de l'environnement. Toutefois, les mécanismes par lesquels les probiotiques renforcent la barrière intestinale ne sont pas bien élucidés (Bermudez-Brito et *al.*, 2012).

En outre, par activation immunologique, les probiotiques peuvent également favoriser l'inhibition de l'agent pathogène par induction de la production des cytokines ou augmentation de la sécrétion d'IgA *in situ* (Pintado et *al.*, 2014b ; Yadav et Shukla, 2017).

L'autre mécanisme d'action pertinent associé aux probiotiques comprend leur capacité à moduler le système immunitaire. Il implique l'activation des cellules du tissu lymphoïde associé à l'intestin, présent dans la lamina propria et la sous-muqueuse (Pintado et *al.*, 2014b).

En effet, l'interaction des probiotiques avec différentes cellules du système immunitaire [entérocytes, cellules dendritiques (CD), Th1, Th2 et T cellules régulatrices] dans l'intestin, module la réponse immunitaire vers une action pro ou anti-inflammatoire (Rossoni et *al.*, 2020).

Certains probiotiques possèdent des propriétés antiallergiques après induction des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β ou réduction de la prolifération des cellules T (Papadimitriou et *al.*, 2015).

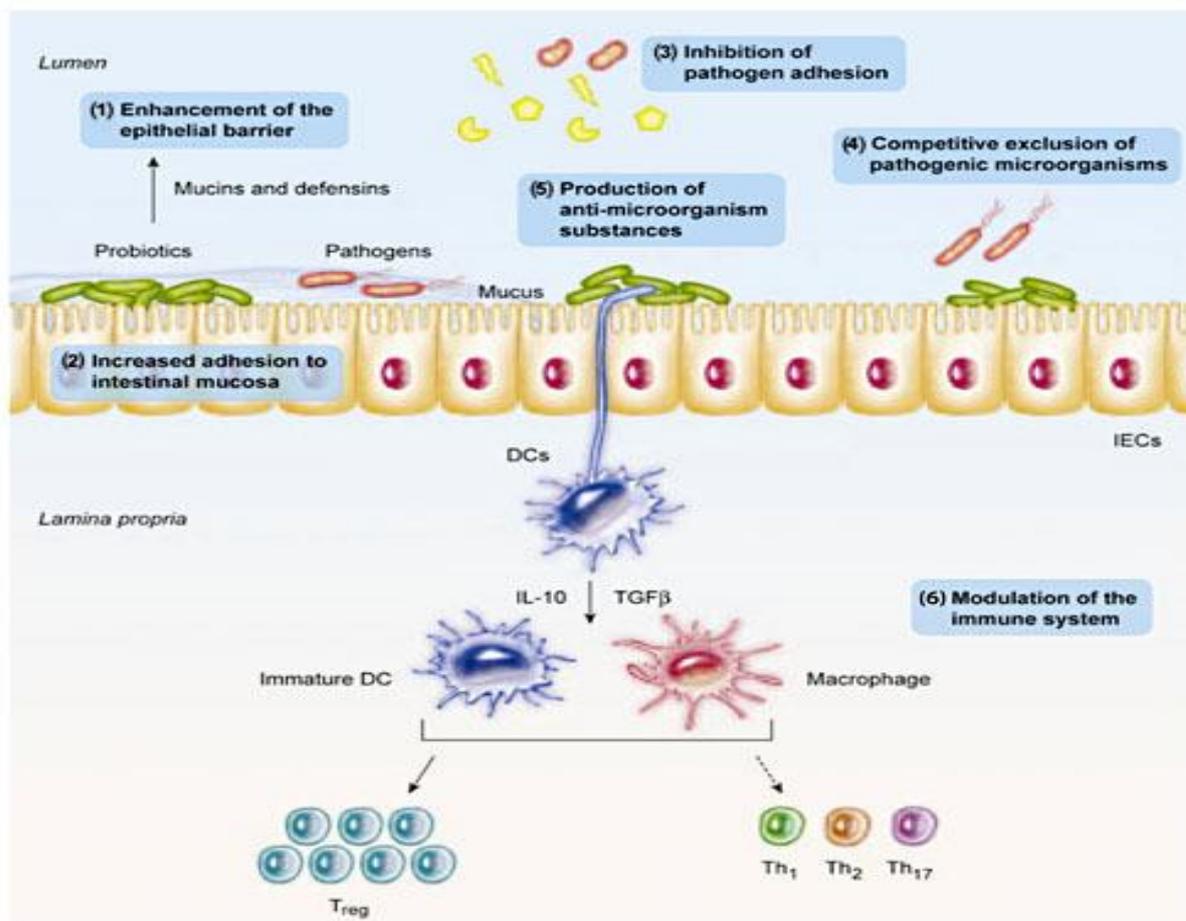


Figure 4. Mécanismes d'action majeurs des probiotiques (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

I.2.5.4. Critères de sélection des probiotiques

Les critères de sélection de nouvelles souches probiotiques sont déterminés par de nombreux facteurs, tels que l'adhérence à la muqueuse intestinale, la capacité de tolérer les conditions du TGI, d'origine humaine (bien que *S. boulardii* ne soit pas d'origine humaine), exercer des effets bénéfiques sur la santé (production des substances antimicrobiennes, réduction du taux de cholestérol, etc.), avoir de bonnes propriétés technologiques et clairement identifiées (Anadón et *al.*, 2016 ; Guinane et *al.*, 2016).

D'autre part, afin d'effectuer une évaluation adéquate de leur innocuité, une souche probiotique doit répondre aux règles de sécurité selon des lignes directrices définies par un système similaire en termes de concept et d'objectif aux niveaux américain et européen, dénommé GRAS (généralement reconnu comme sûr) ou QPS (Présomption qualifiée de sécurité) respectivement (Pintado et *al.*, 2014a).

En outre, un probiotique doit également posséder la capacité de survivre et de conserver la stabilité de leurs caractéristiques désirables pendant la production commerciale ainsi que pendant la période de stockage du produit final. Toutefois, certaines souches montrent une stabilité réduite. Ce problème peut être surmonté en utilisant des techniques d'encapsulation et d'immobilisation assurant une protection contre certains environnements pendant une période prédéterminée (Pintado et *al.*, 2014a ; Tamime et *al.*, 2018).

Pour prouver l'efficacité d'une souche ou d'un produit probiotique, des tests doivent être effectués en utilisant des systèmes de plus en plus complexes, allant des études *in vitro* aux études *in vivo* sur les animaux et sur l'homme (Pintado et *al.*, 2014a).

Malgré le développement des recherches effectuées ces dernières années, il convient de souligner que l'effet des probiotiques reste ambigu et nécessite davantage d'enquêtes pour être confirmé ou validé (Pintado et *al.*, 2014a).

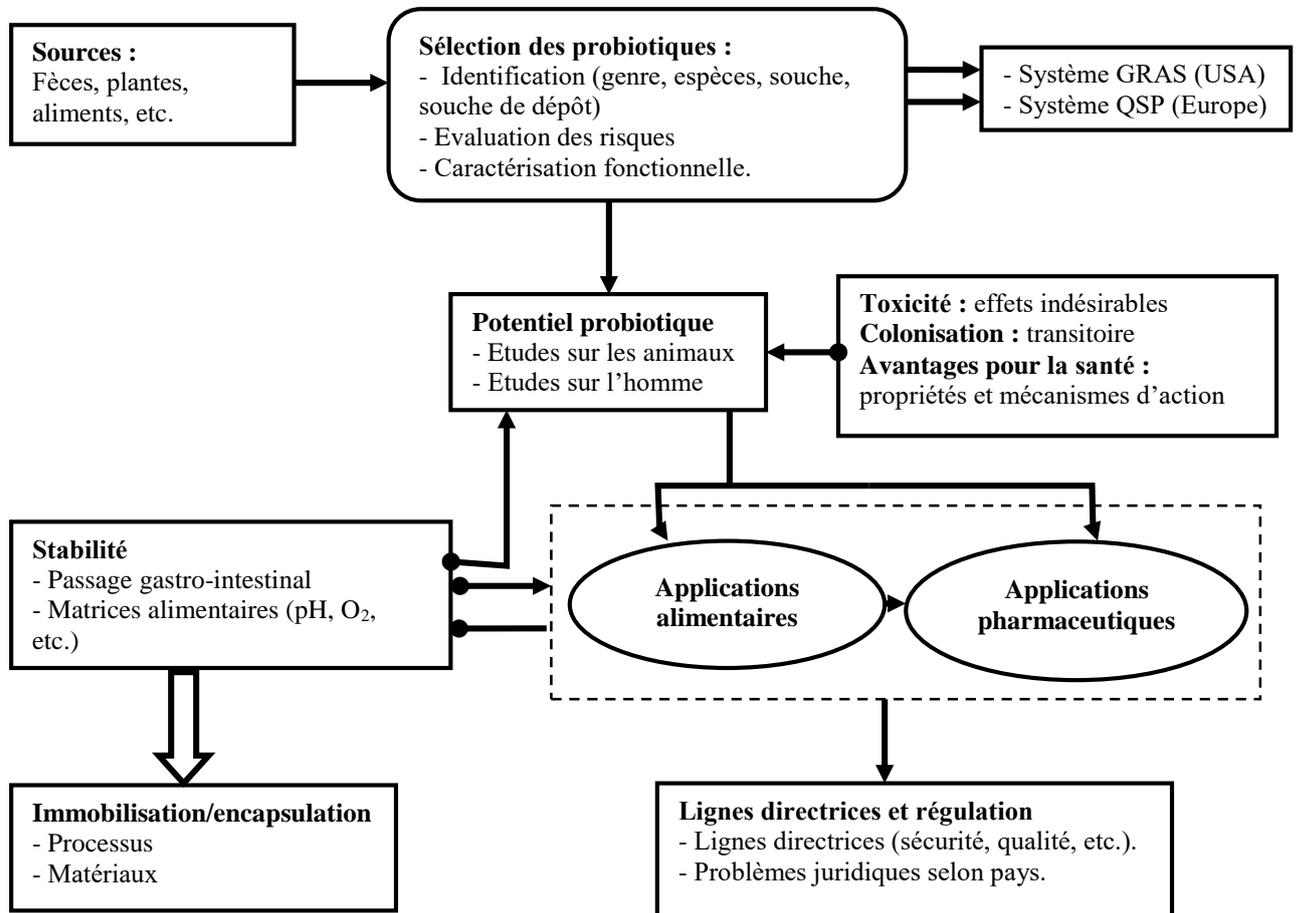


Figure 5. Représentation schématique des étapes séquentielles requises depuis la sélection des probiotiques jusqu'au lancement du produit final sur le marché (Pintado et al., 2014a).

I.2.5.5. Principales propriétés des probiotiques

I.2.5.5.1. Survie aux conditions de stress du TGI

Il s'agit de déterminer la capacité de survie d'un microorganisme dans les différentes parties du TGI. Pour tester sa tolérance ; le lysozyme, le suc gastrique et le liquide jéjunal sont utilisés. Après la mastication, les bactéries doivent survivre à l'acidité de l'estomac avec un pH variant de 1 à 3 pendant 90 min. Dans le duodénum, le pH s'élève à 6-6,5, mais les sels biliaires sont déversés de la vésicule biliaire pour atteindre des concentrations allant de 1,5 à 2 % pendant la première heure de digestion et diminuant ensuite jusqu'à 0,3 % (p/v) ou moins pendant 2,5 et 3 h dans l'intestin grêle. Pour le dépistage des bactéries présumées probiotiques, la plupart des travaux sont effectués simulant ainsi les conditions du TGI *in vitro*. D'après la littérature, la résistance des bactéries lactiques à la bile et à l'acidité est une propriété dépendante de la souche et qui doit être évaluée individuellement (Lee, 2009a ; Lee, 2009b).

I.2.5.5.2. Adhésion/colonisation du TGI

L'**adhésion** de la bactérie à la muqueuse intestinale est une condition préalable à la colonisation (Lee, 2009a). Toutefois, d'après des études, les probiotiques ne colonisent pas les intestins des humains de façon permanente. Une fois l'alimentation a cessé, les microorganismes particuliers ne peuvent plus être détectés dans les fèces après une ou 2 semaines. Il est donc préférable de désigner une colonisation transitoire ou une persistance des probiotiques plutôt qu'une colonisation (Ouwehand et Salminen, 2003).

L'adhésion est un processus complexe qui implique des mécanismes spécifiques et non spécifiques. Les mécanismes spécifiques sont médiés par des molécules spécifiques telles que les adhésines et les récepteurs complémentaires. Tandis que, ceux non spécifiques sont influencés par l'hydrophobie ou l'hydrophilie des bactéries ainsi que par la charge superficielle de substrat (Krausova et *al.*, 2016).

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer l'adhésion des microorganismes probiotiques. Certains de ces facteurs sont liés au mode de culture adopté *in vitro* : concentration bactérienne, composition du tampon, temps d'incubation et le milieu de culture. D'autres facteurs influençant l'adhésion sont liés aux conditions, digestion et matrice alimentaire. Le taux d'adhésion dépend également des conditions *in vivo*, tels que : le microbiote intestinal normal, le pH, la présence des sucres, des sels biliaires, du calcium et d'autres composés. Ainsi,

les sels biliaires diminuent significativement l'adhérence, alors que l'ajout du calcium a un effet favorable (Ouwehand et Salminen, 2003 ; Krausova et *al.*, 2016).

L'auto-agrégation ou l'agrégation entre les bactéries probiotiques de la même souche est une propriété souhaitable pour leur adhésion dans plusieurs niches écologiques, surtout dans l'intestin humain où elles doivent être actives.

La co-agrégation ou l'agrégation bactérienne entre les souches probiotiques et les agents pathogènes intestinaux potentiels joue un rôle important sur la santé humaine. Ainsi, de nombreux auteurs ont signalé que les capacités de co-agrégation des espèces de *Lactobacillus* participent à la formation d'une barrière empêchant la colonisation par des microorganismes pathogènes. En outre, Il a été suggéré que les LAB productrices de bactériocines, qui se coagrègent avec les pathogènes, peuvent constituer un mécanisme important de défense de l'hôte (Kos et *al.*, 2003 ; Lahtinen et Salminen, 2009b).

I.2.5.5.3. Activité antimicrobienne

La protection contre les agents pathogènes dans le TGI est l'une des propriétés les plus importantes que doit posséder un probiotique. En outre, les microorganismes antagonistes et leurs métabolites antimicrobiens peuvent être employés comme des biopréservateurs qui contrôlent et inactivent la croissance des microorganismes indésirables dans les aliments (Reis et *al.*, 2012).

Les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques peuvent être divisées en 2 principaux groupes :

- Les composés de faible masse moléculaire <1000 Da, comprenant toutes les substances antimicrobiennes produites par les LAB sauf les bactériocines. Elles ont un large spectre ;
- Les protéines antimicrobiennes ou bactériocines avec un poids moléculaire >1000 Da ; Elles ont une spécificité d'action relativement étroite contre les organismes apparentés et d'autres bactéries à Gram positif (Collado et *al.*, 2010; Šušković et *al.*, 2010).

Les principaux composés antimicrobiens résultant du métabolisme des bactéries lactiques après fermentation des glucides sont constitués par **les acides organiques**. Leur effet inhibiteur est principalement causé par la forme non dissociée de la molécule, qui se diffuse à travers la

membrane cellulaire vers le cytoplasme plus alcalin et interfère avec les fonctions métaboliques essentielles.

Les effets toxiques des acides organiques comprennent la réduction du pH intracellulaire et la dissipation du potentiel de la membrane (Collado et *al.*, 2010; Šušková et *al.*, 2010).

En présence d'oxygène, certains probiotiques sont capables de produire **le peroxyde d'hydrogène** ayant un effet bactéricide. Il est dû grâce à son fort effet oxydant sur la cellule bactérienne et à la destruction des structures moléculaires de base ou les protéines cellulaires (Šušková et *al.*, 2010).

Le dioxyde de carbone produit par les bactéries hétérofermentaires participe à la préservation des aliments par création d'un environnement anaérobie. Comme il inhibe les décarboxylations enzymatiques après son accumulation dans la bicouche lipidique entraînant un dysfonctionnement de la perméabilité de la membrane (Ouwehand et Vesterlund, 2004 ; Šušková et *al.*, 2010).

Le diacétyle (2,3-butanedione) est connu pour l'arôme du beurre qu'il confère aux produits laitiers fermentés. Il joue également un rôle dans la conservation des aliments à condition qu'il soit en concentration élevée (Šušková et *al.*, 2010).

La reutéline et la reutélicycline, ces 2 substances actives à faible poids moléculaire sont produites par *Lactobacillus reuteri*. La reutéline a un très large spectre d'activité antimicrobienne. Elle est active vis-à-vis des bactéries, des champignons, des protozoaires et des virus. Toutefois, la reutélicycline a un spectre étroit et elle est active seulement contre les bactéries à Gram positif (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines synthétisées par des ribosomes ayant une activité bactéricide contre les espèces bactériennes étroitement liées à l'espèce productrice. Elles sont produites par les bactéries à Gram positif, habituellement les bactéries lactiques et inhibent les souches identiques ou les espèces étroitement apparentées. Les bactériocines produites par les LAB d'origine alimentaire ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur application potentielle dans la bioconservation naturelle des aliments (Collado et *al.*, 2010; Šušková et *al.*, 2010).

Sur la base de leurs propriétés biochimiques, les bactériocines ont été subdivisées en 4 classes: **Classe I : les lantibiotiques**, comprennent les petits peptides thermostables (5 kDa) qui ont subi des modifications post-traductionnelles pour contenir des acides aminés tels que : la lanthionine et β -méthylanthionine, et divers acides aminés déshydratés.

Classe II est constituée de bactériocines thermostables non modifiées qui comprennent des peptides de masse moléculaire <10 kDa. Cette classe comporte 3 sous-groupes : classe IIa (bactériocines de type pédiocine), classe IIb (bactériocines à 2 peptides) et classe IIc (autres bactériocines à un peptide).

Classe III comprend les grandes protéines (>30 kDa) thermosensibles.

Classe IV comprend un groupe non défini de mélange de protéines, de lipides et de glucides (Collado et al., 2010 ; Borges et al., 2016).

I.2.5.6. Sécurité d'utilisation des bactéries probiotiques

Il est très important que la sécurité de nouveaux probiotiques soit assurée et devrait être toujours évaluée dans un cadre clinique avant leur incorporation dans les produits commerciaux (Lahtinen et Salminen, 2009a).

Des bactéries telles que les espèces de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* ont été largement utilisées dans la transformation des aliments tout au long de l'histoire de l'humanité, et l'ingestion des aliments contenant des bactéries vivantes, des bactéries mortes et des métabolites de ces microorganismes a eu lieu depuis longtemps.

Sur le plan écologique, les bifidobactéries sont présentes en tant que des bactéries prédominantes dans le tractus intestinal des nourrissons allaités au sein et sont considérées comme contribuant à leur santé. Jusqu'à présent, la sécurité de ces bactéries n'a pas été mise en doute, et les rapports qui ont signalé leurs effets nocifs sur l'hôte sont rares.

Néanmoins, au cours de ces dernières années, de nombreuses espèces des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Bifidobacterium* ont été fréquemment isolées à partir de divers types de lésions infectieuses (Tab.5) (Ishibashi et Yamazaki, 2001).

Tableau 5. Bactéries lactiques et bifidobactéries isolées d'endocardites, de bactériémies et d'infections sanguines locales (Ishibashi et Yamazaki, 2001).

Genre	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus, plantarum, casei, paracasei, salivarius, acidophilus, gasseri, leichmanii, jensenii, confusus, brevis, bulgaricus, lactis, fermentum, minutus, et catenaforme sp.</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides, paramesenteroides, citreum, pseudomesenteroides, et lactis sp.</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici et pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>dentium (eriksonii) et adolescentis sp.</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis, faecium, avium, et d'autres</i>

Il existe 3 préoccupations théoriques concernant la sécurité des organismes probiotiques : (1) l'apparition des maladies, telles que les bactériémies ou les endocardites ; (2) les effets toxiques ou métaboliques sur le TGI ; et (3) le transfert de la résistance aux antibiotiques dans la flore gastro-intestinale (Snydman, 2008).

Certains risques indésirables peuvent survenir suite à l'utilisation des probiotiques chez l'homme. Ils comprennent le potentiel de transmigration et par conséquent, la colonisation par des probiotiques peut avoir un impact négatif sur la physiologie et la fonction gastro-intestinale, y compris des effets métaboliques et physiologiques.

Des effets immunologiques négatifs localisés et généralisés peuvent se développer. Enfin, il existe également un risque de transfert des facteurs de résistance aux antibiotiques des bactéries commensales ou probiotiques vers d'autres bactéries ou agents pathogènes potentiels dans le TGI (Snydman, 2008).

Selon les directives de FAO/WHO pour l'évaluation des probiotiques dans les aliments (2002), il est suggéré que les organismes probiotiques peuvent théoriquement être responsables d'effets secondaires, notamment d'infections systémiques, d'activités métaboliques délétères, d'une stimulation immunitaire excessive chez les individus sensibles et du transfert des gènes.

Pour assurer donc la sécurité des organismes probiotiques dans les aliments, les lignes directrices de la FAO/WHO (2002) suggèrent de tester les souches probiotiques afin de

déterminer les profils de résistance aux antibiotiques, certains potentiels métaboliques (par exemple, la production de D-lactate, la déconjugaison des sels biliaries) et hémolytiques, la production des toxines, les effets secondaires et la surveillance épidémiologique des incidents indésirables au cours des études sur l'homme et le déficit d'infectivité chez les animaux immunodéprimés (Ashraf et Shah, 2011).

I.2.5.7. Effets des probiotiques sur la santé

Plusieurs avantages pour la santé sont attribués à l'ingestion des probiotiques dont certains ont été prouvés scientifiquement et d'autres nécessitent encore des études plus approfondies chez l'homme (Fig. 6).

Les principaux avantages associés à la consommation des probiotiques sont les suivants (Granato *et al.*, 2010 ; Yadav et Shukla, 2017) :

- Les activités antimicrobiennes et antimutagènes,
- les propriétés anticancérogènes et antihypertensives,
- améliorer l'état nutritionnel de l'individu et le système immunitaire,
- augmenter la disponibilité des vitamines, des minéraux et des oligo-éléments pour l'organisme,
- diminuer les symptômes de l'intolérance au lactose,
- prévention et traitement de la diarrhée due à une infection, de la diarrhée du voyageur, de la diarrhée virale aiguë chez l'enfant, de la diarrhée associée à un surdosage d'antibiotiques et de la diarrhée due à une exposition à l'irradiation,
- amélioration,
- augmentation de la motilité du gros intestin qui aide à soulager la constipation,
- atténuation des symptômes intestinaux et du syndrome de Crohn,
- la réduction des symptômes d'allergies alimentaires et du taux de cholestérol LDL.

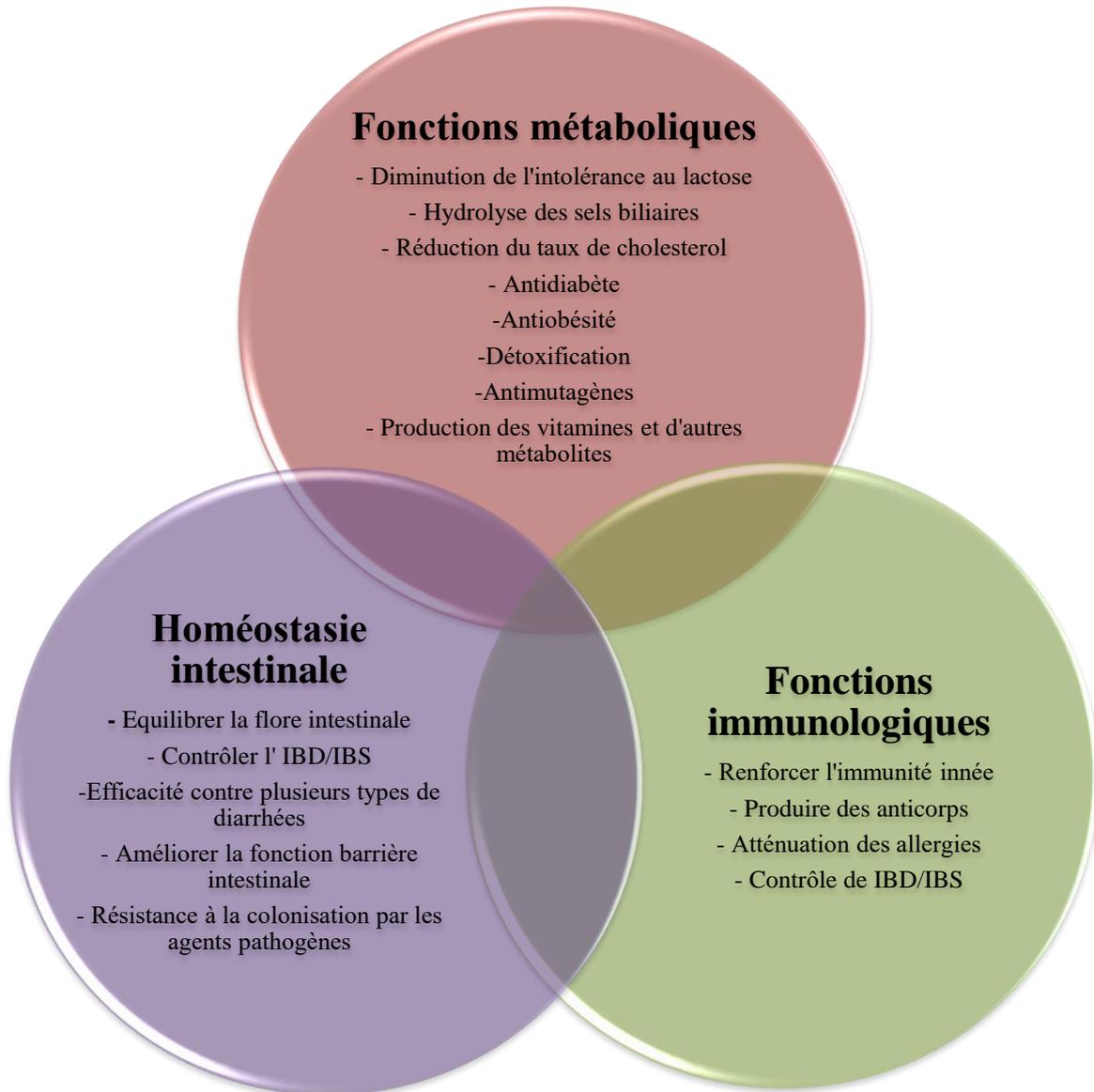


Figure 6. Quelques effets bénéfiques des probiotiques sur la santé (Bajaj *et al.*, 2015).

Chapitre II : Evaluation de la sécurité de consommation du lait de chamelle à l'état cru

II.1. Introduction

En raison de ses propriétés favorables à la santé, le lait de chamelle est consommé cru par les bédouins qui le considèrent comme sûr. Grâce à sa haute teneur en protéines inhibitrices contre les bactéries indésirables, il se préserve mieux que celui de la vache même à des températures élevées et en hygiène très élémentaire. Cependant, plusieurs études ont indiqué que sa consommation dans cet état est dangereuse. Cette insécurité est liée à la contamination du lait lors de la traite, du transport et du stockage. En outre, elle peut avoir lieu en cas des mammites cliniques ou subcliniques, permettant le passage des bactéries pathogènes du trayon du pis vers le lait (Younan, 2004).

Compte tenu du manque de production et de commercialisation du lait de chamelle en Algérie, les consommateurs, en particulier les malades, se déplacent vers des endroits de pâturage des chameaux et ils le prennent cru immédiatement après le prélèvement de l'animal. Pour ce faire, ce chapitre vise à évaluer la sécurité de la consommation du lait de chamelle cru dans le sud-est Algérien prélevé à partir des chameaux individuelles et manipulé sous des conditions d'hygiène rigoureuses.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Collecte du lait

Au total, treize échantillons du lait camelin ont été collectés à partir de 3 régions du Sud-Est Algérien qui sont : M'sila (Maârif : 35° 24' 55" Nord latitude, 4° 20' 39" Est longitude), Biskra (El Ghrous : 34° 42' 19" Nord latitude, 5° 17' 7" Est longitude) et Oued Souf (Still : 34° 15' 34" Nord latitude, 5° 54' 50" Est longitude) (Fig.7) à différentes saisons de l'année.

Les dates de collecte et le nombre des échantillons du lait prélevés à partir de chaque région sont montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6. Nombre des échantillons du lait de chamelle et périodes de collecte.		
Régions	Nombre d'échantillons	Dates de collecte
Biskra	4	25 /03/2015
M'sila	4	25 /08/2015
Oued Souf	5	10/12/2016



Figure 7. Localisation des sites de prélèvement des échantillons du lait camelin.

Les pis des femelles qui apparaissent saines ont été lavés, désinfectés par l'éthanol 70° et séchés. Avant la traite, les éleveurs lavent bien les mains et portent des gants. Les premiers jets sont éliminés, après cela, le lait a été récupéré dans des flacons stériles de 200 à 250 mL de contenance puis transportés à 4 °C jusqu'au laboratoire. L'analyse des échantillons a été effectuée dans les 24 h qui suivent le prélèvement.

II.2.2. Estimation de la qualité microbiologique et de l'acidité du lait

La qualité microbiologique du lait a été estimée par le test de réduction de bleu de méthylène. Un volume de 1 mL d'une solution de bleu de méthylène (5 mg/100 mL) a été transféré dans des tubes stériles contenant 10 mL de chaque échantillon de lait. Ils sont incubés ensuite à 37 °C et agités toutes les 30 min. Le temps de disparition de la couleur bleue a été noté. Ceci indique une réduction du bleu de méthylène par l'oxygène due à une activité microbienne. Lorsque le temps de réduction du bleu de méthylène(t) est :

< 2 h : le lait est contaminé,

2 h < t < 4 h : lait est peu contaminé,

t > 4 h : lait est de bonne qualité (Guiraud, 2003; Sharma, 2006; Worku et *al.*, 2012).

Les valeurs de pH de tous les échantillons ont été mesurées à l'aide d'un pH mètre (HANNA instruments).

II.2.3. Analyse microbiologique

Le dénombrement des différents groupes microbiens du lait a été fait selon les méthodes décrites par Guiraud (2003).

Tableau 7. Milieux et conditions de culture des microorganismes dénombrés.

	Milieux de culture	Volumeensemencé	Méthodes d'inoculation	Incubation	
				(T °C)	Temps(h)
Groupes microbiens					
FAMT	PCA	1 mL	Masse	30 °C	72 h
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG	1 mL	Double couches	37 °C	48 h
<i>Enterococcus</i>	BEA	0,1 mL	Surface	37 °C	48 h
<i>Staphylococcus spp.</i>	Chapman	0,1 mL	Surface	37 °C	48 h
Levures/moisissures	PDA	1 mL	Masse	28 °C	5 jours

PCA: Plate Count Agar; VRBG: Violet Red Bile Glucose Agar; BEA: Bile Esculine Agar; PDA: Potato Dextrose Agar

Tout d'abord, une série de dilutions jusqu'à 10^{-3} a été préparée en utilisant des tubes contenant l'eau physiologique stérile (0,85 %). Le lait et leur dilutions ont été transférés directement dans des boîtes de Pétri contenant les milieux appropriés pour la culture de chaque groupe microbien (Tab.7). Après incubation, les colonies sont comptées et le nombre des microorganismes (UFC/mL) représente la moyenne de deux répétitions.

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Estimation de la qualité microbiologique et de l'acidité du lait

Tous les échantillons de lait ont réduit le bleu de méthylène après 4 heures d'incubation, ce qui indique que le lait est de bonne qualité microbiologique. Le résultat obtenu ne concorde pas avec celui de Siboukeur (2007) qui a constaté que le temps de réduction du bleu de méthylène est de 2 heures pour la plupart des échantillons du lait de chamelle testés.

Le pH donne une mesure de l'acidité réelle du lait et permet de détecter le lait anormal des chamelles atteintes de mammites (Sharma, 2006). Les valeurs de pH mesurées pour les échantillons de lait de chamelle se situent entre (6,46-6,77) avec une moyenne de $6,64 \pm 0,08$. Les valeurs obtenues sont très proches de celles mentionnées par la FAO (1982) : (6,5-6,7) correspondant à celle du lait de chamelle frais, ainsi que par d'autres auteurs, Yam et *al.* (2014) (6,4-6,7) et Meribai (2018) (6,58-6,65).

Cependant, le pH obtenu est supérieur à celui mentionné par Siboukeur (2007) et Benyagoub et Ayat (2016) qui ont trouvé un pH de 6,2 et 5,67 respectivement.

II.3.2. Analyse microbiologique

Les différents groupes microbiens présents dans les échantillons du lait examinés sont dénombrés et les résultats sont représentés dans la Fig. 8 et le Tab. 8.

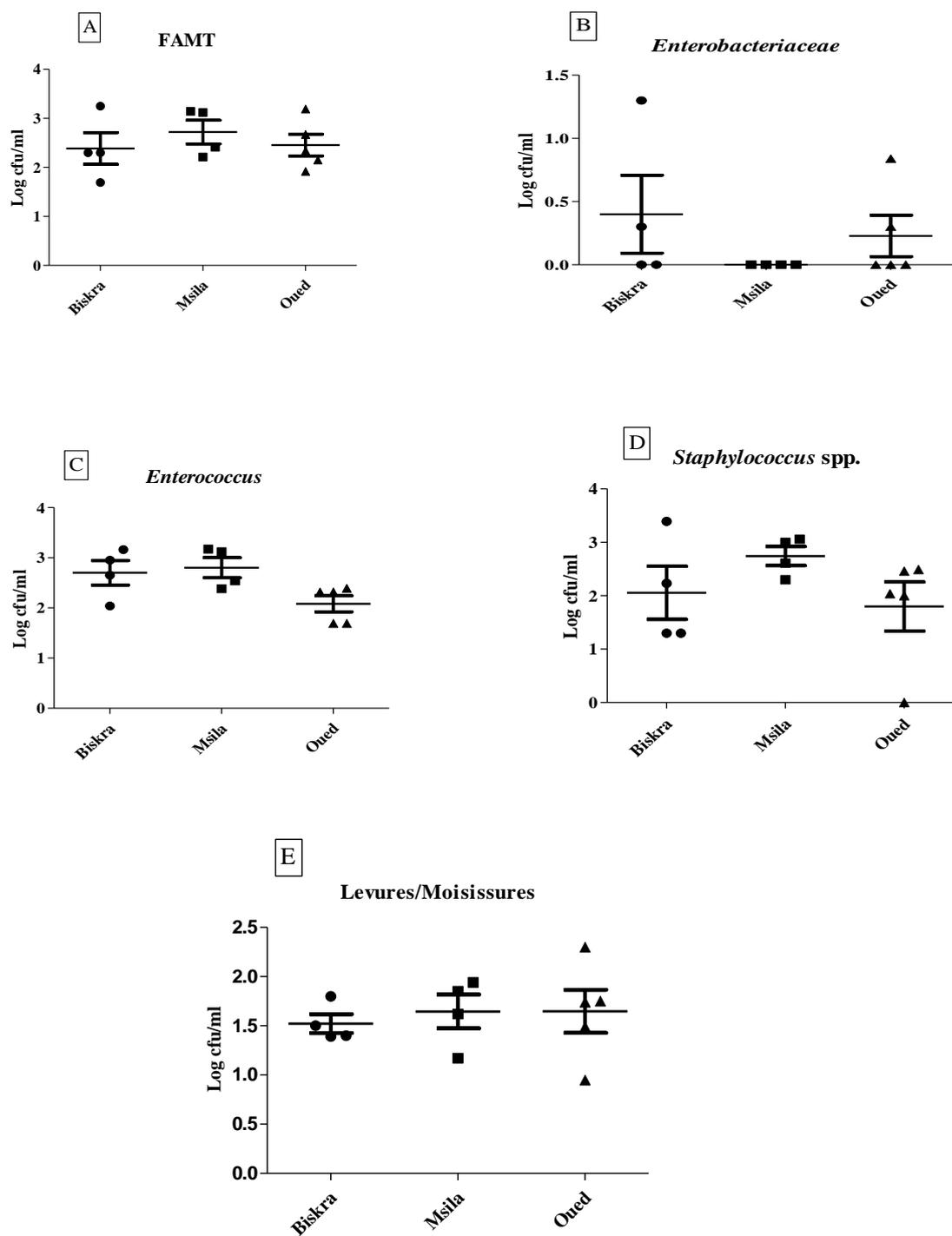


Figure 8. Graphiques en nuage de points de la flore aérobie mésophile totale (FAMT), *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* spp., levures et moisissures présents dans les échantillons du lait de chamelle.

Tableau 8. Nombre des microorganismes (Log UFC/mL) dans les échantillons du lait de chamelle.

Groupes microbiens	Minimum	Maximum	Moyenne	SD
Flore aérobie mésophile totale	1,69	3,25	2,51	0,51
<i>Enterobacteriaceae</i>	ND	1,30	0,21	0,4
<i>Enterococcus</i>	1,69	3,17	2,49	0,5
<i>Staphylococcus</i> spp.	ND	3,39	2,17	0,89
Levures/moisissures	0,95	2,3	1,60	0,34

SD: écart type

ND: Non déterminé

La flore aérobie mésophile totale est un bon indicateur de contamination du lait (Harding, 1995). Leur moyenne est de $2,51 \pm 0,51$ Log UFC/mL. Le résultat obtenu est très proche de celui rapporté par Kaindi et al. (2011) (3.6×10^2 UFC/mL).

Cependant, plusieurs auteurs : Benkerroum et al. (2003), El-Ziney et Al-Turki (2007), Omer et Eltinay (2008), Jrad et al. (2013), Merzouk et al. (2013), Yam et al. (2014), Benyagoub et Ayat (2015), Alaoui Ismaili et al. (2016b), Elhosseney et al. (2018) et Makgoeng et al. (2018) ont rapporté des niveaux plus élevés.

Selon les résultats montrés dans la Fig. 8, les entérobactéries ont été détectées dans 4 échantillons (30.76 %) avec une moyenne de $0,21 \pm 0,4$ Log UFC/mL. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par : El-Ziney et Al-Turki (2007), Kaindi et al. (2011), Yam et al. (2014), et Elhosseney et al. (2018) qui ont rapporté des valeurs très élevées.

La présence des entérobactéries dans le lait qui sont des indicateurs de contamination fécale avec une faible fréquence indique les bonnes conditions d'hygiène pendant la traite et le transport des échantillons de lait de chamelle.

Le nombre total des entérocoques se situe entre 1,69 Log UFC/mL et 3,17 Log UFC/mL avec une moyenne de 2,49 Log UFC/mL. Ce résultat est presque similaire à celui obtenu par Kaindi et al. (2011) ($1,7 \times 10^2$ UFC/mL). Par contre, Benkerroum et al. (2003) et Alaoui Ismaili et al. (2016b) ont rapporté des valeurs très élevées (2.9×10^4 UFC/mL) et (3.7×10^6 UFC/mL) respectivement.

La plupart des espèces d'entérocoques sont associées aux intestins des humains et des animaux domestiques et leur présence dans le lait indique une contamination fécale (Devriese et al., 2006). Par ailleurs, Benkerroum et al. (2003), Davati et al. (2015) et Alaoui Ismaili et al. (2016a) ont déterminé une dominance de ce genre dans le lait de chamelle par rapport aux autres

bactéries lactiques avec des pourcentages de 58,8, 51 et 53,6 respectivement. Il semble que la salinité du lait de chamelle favorise leur abondance car les membres de ce genre sont caractérisés par leur résistance aux sels.

Les staphylococci sont présents dans presque tous les échantillons examinés avec une moyenne de $2,17 \pm 0,89$ Log UFC/mL. Cette valeur est presque similaire à celle rapportée par Kaindi et *al.* (2011).

Merzouk et *al.* (2013) et Yam et *al.* (2014) ont rapporté des valeurs plus faibles. Cependant, Omer et Eltinay (2008) et Elhosseney et *al.* (2018) ont trouvé des valeurs plus élevées.

La fréquence relativement élevée des *Staphylococcus* spp. peut être attribuée aux infections des pis par des mammites cliniques ou subcliniques (Elhosseney et *al.*, 2018). Elle peut également être associée au milieu utilisé pour le dénombrement (Chapman) qui permet la croissance d'autres halotolérants présents dans le lait de chamelle caractérisé par sa salinité relativement élevée (Siboukeur, 2007).

La valeur moyenne obtenue des levures et des moisissures est de $1,60 \log \pm 0,34$ UFC/mL. Elle est très proche de celle obtenue par Kaindi et *al.* (2011) et Omer et Eltinay (2008). Cependant, Benkerroum et *al.* (2003), Yam et *al.* (2014), Benyagoub et Ayat (2015) ont trouvé des valeurs plus élevées. Le niveau élevé des levures et des moisissures dans le lait est plutôt rare en raison du pH naturel du lait favorisant la dominance des bactéries (EL-Ziney et Al-Turki, 2007 ; Alaoui Ismaili et *al.*, 2016b).

Chapitre III : Sélection, identification des bactéries lactiques à potentiel probiotique et évaluation de leur innocuité

III.1. Introduction

L'intérêt pour les microorganismes présents dans les aliments est principalement dû à leur potentiel thérapeutique et biotechnologique. D'autre part, l'utilisation excessive d'antibiotiques pose un problème de santé publique mondiale responsable de l'apparition des bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques (Gupta et Sharma, 2017). Par conséquent, la recherche de nouvelles souches microbiennes ayant des qualités probiotiques est une nécessité de temps.

Les produits fermentés du lait de chamelle sont riches en LAB considérées comme un groupe majeur des bactéries probiotiques.

Pour ce faire, l'objectif de cette partie est d'isoler et de sélectionner des LAB qui possèdent des propriétés probiotiques telles que : l'activité antimicrobienne, l'hydrophobie, l'auto-agrégation, la co-agrégation, la résistance aux conditions du TGI puis de vérifier leur innocuité. Enfin, d'identifier les souches probiotiques sélectionnées par des méthodes phénotypiques et génotypiques.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Isolement des bactéries lactiques

Pour effectuer l'isolement des bactéries lactiques, les mêmes échantillons du lait analysés précédemment ont été utilisés. Par ailleurs, une étape d'enrichissement spontanée de ces bactéries a été nécessaire après incubation des échantillons du lait de chamelle à 30 °C jusqu'à la coagulation.

En utilisant des tubes contenant l'eau physiologique stérile (0,85 %), une série de dilutions jusqu'à 10^{-6} a été réalisée. Ensuite, 100 µL du lait et de ses dilutions ont été déposés sur la surface solide des boîtes de Pétri contenant les milieux MRS ou M17 puis incubées à 30 °C pendant 3 à 5 jours.

A partir des boîtes contenant 10-300 UFC/mL, 3 à 5 colonies sont prélevées au hasard puis purifiées par des repiquages successifs sur les milieux appropriés jusqu'à l'obtention d'un isolat pur (Jans et *al.*, 2012).

Le type de Gram et la catalase ont été vérifiés chez toutes les bactéries isolées. Les isolats à Gram positif et catalase négative présumés comme lactiques ont été retenus. Ils sont conservés à -20 °C dans des tubes eppendorf contenant le bouillon MRS additionné de 30 % de glycérol (v/v) (Blajman et *al.*, 2015).

III.2.2. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques

III.2.2.1. Dépistage du pouvoir antagoniste des isolats lactiques contre des bactéries pathogènes par le test des spots sur agar

Pour détecter l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis des souches pathogènes (Tab. 9), la méthode des spots sur agar a été appliquée. Dans ce test, les souches lactiques et indicatrices sont cultivées ensemble et l'antagonisme dépend de la libération d'un inhibiteur diffusible au début de la croissance des LAB (Polak-Berecka et *al.*, 2009). Pour cela, le protocole décrit par Oliveira et *al.* (2008) a été suivi.

Brièvement, 2 µL des bouillons MRS ensemencés par chaque LAB ont été déposés sur la surface sèche des boîtes contenant le milieu MRS solide puis incubés à 30 °C pendant 24 h. Ensuite, des tubes contenant 7 mL du milieu Muller-Hinton (0,7 % agar) ont été ensemencés par chaque bactérie pathogène ($\approx 10^8$ UFC/mL) puis versés sur la surface de la gélose MRS contenant des spots résultant de la croissance des LAB.

Les boîtes ont été réincubées à 37 °C pendant 24 h pour permettre la croissance des bactéries pathogènes.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés à partir du centre du spot bactérien.

Tableau 9. Liste des souches pathogènes.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline (SARM) ATCC 43300
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Listeria innocua</i> CLIP 74915

III.2.2.2. Propriétés adhésives

III.2.2.2.1. Hydrophobicité

Seules les bactéries lactiques actives envers toutes les souches indicatrices ont été sélectionnées pour tester leur pouvoir d'hydrophobicité, en suivant les étapes du protocole décrit par Klayraung *et al.* (2008):

- Des tubes contenant 6 mL de bouillon MRS ont été inoculés par chaque isolat lactique et incubés à 30 °C pendant 18 à 24 h.
- Les cultures bactériennes sont centrifugées à 4500 g pendant 15 min puis lavées 2 fois par le tampon phosphate potassium (50 mM, pH 6,5) (Annexe 2).
- Le culot cellulaire a été récupéré dans le même tampon et ajusté à une absorbance de 0,8 à 1 à 560 nm (A_0).
- 3 mL de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 0,6 mL de xylène puis vortexés vigoureusement pendant 120 secondes.
- Après 30 min d'incubation à 30 °C, les 2 phases sont séparées. La phase aqueuse a été récupérée délicatement avec mesure de son absorbance (A_1).
- L'hydrophobicité (H %) a été calculée à partir de 3 répétitions comme étant le pourcentage de diminution de la DO de la suspension aqueuse bactérienne initiale due à la séparation des cellules en une couche hydrocarbonée selon la formule :

$$H \% = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Afin de démontrer leur potentiel probiotique, seules les souches lactiques avec un pourcentage d'hydrophobicité ≥ 35 % ont été retenues pour les prochains tests.

III.2.2.2.2. Auto-agrégation

L'auto-agrégation a été réalisée selon la méthode décrite par Abdulla *et al.* (2014):

Des cultures bactériennes de 18 h incubées à 30 °C ont été centrifugées à 4500 g pendant 15 min. Un lavage 2 fois a été fait en utilisant le tampon PBS (pH 7,2) (Annexe 2) et les culots contenant les bactéries lactiques sont récupérés dans le même tampon puis ajustés à environ 10^8 UFC/mL.

Après, 4 mL de chaque suspension bactérienne sont vortexés pendant 10 secondes et les tubes sont incubés à une température ambiante pendant 5 h. Ensuite, 100 μ L de la suspension superficielle sont transférés vers un autre tube contenant 3,9 mL de PBS.

Les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 600 nm et les pourcentages d'auto-agrégation ont été calculés selon l'équation suivante :

$$1 - (A_t / A_0) \times 100$$

A₀: DO à 0h

A_t: DO à 5 h

III.2.2.2.3. Co-agrégation

Les pourcentages de co-agrégation entre les souches lactiques et 2 souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Escherichia coli* ATCC25922) ont été déterminés selon la méthode décrite par Kos et al. (2003) basée sur les mesures des densités optiques des souches lactiques en absence et en présence du pathogène.

Tout d'abord, la préparation des souches bactériennes a été faite en suivant les mêmes étapes que celles décrites dans l'auto-agrégation. Ensuite, un volume de 2 mL de la suspension contenant chaque souche lactique a été mélangé avec 2 mL contenant chacune des bactéries pathogènes. Ce mélange a été mixé pendant 10s et incubé à une température ambiante pendant 5 h.

Des tubes témoins ont été préparés en même temps, contenant 4 mL de chaque suspension bactérienne seule. L'absorbance (A) à 600 nm des suspensions bactériennes a été mesurée après le mélange et après 5 h d'incubation à température ambiante. Les échantillons ont été prélevés de la même manière que celle pour le test d'auto-agrégation.

Les pourcentages de la co-agrégation (%) sont calculés selon l'équation :

$$\text{Co-agrégation (\%)} = \frac{[(A_{\text{patho}} + A_{\text{LAB}})/2] - A_{\text{mix}}}{(A_{\text{patho}} + A_{\text{LAB}})/2} \times 100$$

A_{LAB} : l'absorbance mesurée chez la bactérie lactique seule

A_{path} : l'absorbance mesurée chez la souche pathogène seule

A_{mix} : l'absorbance du mélange (bactérie lactique-souche pathogène) après 5 h d'incubation.

III.2.2.3. Résistance aux conditions gastriques

III.2.2.3.1. Tolérance à l'acidité

Pour tester la résistance des souches lactiques à l'acidité, des cultures bactériennes de (16 à 18 h) ont été centrifugées à 4500 g pendant 15 min et lavées 2 fois en utilisant le tampon PBS (pH

7,2). Les culots bactériens ont été récupérés dans des tubes contenant le PBS ajusté à différentes valeurs de pH : 2, 3 et 6,2 (contrôle).

La DO de chaque suspension bactérienne a été ajustée à une valeur $\geq 1,2$ à 650 nm correspondant à environ 10^8 UFC/mL. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 3 h reflétant le temps de passage des aliments dans l'estomac. Une série de dilutions jusqu'à 10^{-6} a été faite à 0 h et après 3 h d'incubation. Ensuite, 100 μ L ont été ensemencés dans des boîtes contenant la gélose MRS puis incubées à 30 °C pendant 24 à 48h.

Après, les bactéries sont dénombrées et le taux de survie a été calculé en suivant l'équation :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{Log UFC N1}}{\text{Log UFC N0}} \times 100$$

(N0: représente le nombre total des cellules viables au temps 0 h , N1: représente le nombre total des bactéries viables après 3 h) (Shukla et *al.*, 2014; Ruiz et *al.*, 2016).

III.2.2.3.2. Tolérance aux sels biliaires

Pour exercer leurs effets bénéfiques dans le TGI, les LAB doivent résister à la toxicité des sels biliaires qui a été testée en suivant les étapes du protocole décrit par Ruiz et *al.* (2016):

Des bouillons MRS sont ensemencés chacun par une souche lactique, puis centrifugés à 4500 g pendant 15 min. Les cellules bactériennes sont lavées 2 fois en utilisant le tampon PBS (pH 7,2). Ensuite, les culots bactériens sont récupérés dans des tubes contenant le tampon PBS ajusté à pH 8 avec des concentrations de 0,3 % et 0,5 % des sels biliaires. La DO de chaque suspension bactérienne a été ajustée à une valeur $\geq 1,2$ à 650 nm ($\approx 10^8$ UFC/mL) et les tubes sont incubés à 37 °C pendant 4 h qui reflète le temps de passage des aliments dans le duodénum. Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules viables (UFC/mL) à 4 h par rapport à l'inoculum initial à 0 h.

III.2.2.3.3. Tolérance à 0,4 % de phénols

La capacité des souches lactiques de se développer en présence de phénols a été évaluée selon la méthode décrite par Vizoso Pinto et *al.* (2006). Des bouillons MRS additionnés de 0,4 % de phénols et d'autres sans phénols ont été inoculés par 1 % (v/v) de chaque culture bactérienne de 16 à 18 h puis incubés à 37 °C pendant 24 h. Pour compter les bactéries viables, une série de dilutions a été réalisée jusqu'à 10^{-6} et 100 μ L de chaque dilution ont été ensemencés sur la gélose MRS au temps 0 h et après 24 h d'incubation.

Analyse statistique

L'analyse statistique des données obtenues a été effectuée à l'aide du logiciel R (version 3.5.1). Les comparaisons des différences entre les moyennes des traitements répétés 3 fois ont été faites par une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) suivie du test de Tukey à un niveau de signification de $P < 0,05$.

Pour déterminer les souches probiotiques les plus actives par rapport à l'ensemble des souches sélectionnées, une ACP est réalisée par le logiciel XLstat 2020.

III.2.3. Evaluation de la sécurité des souches présumées probiotiques

III.2.3.1. Pouvoir hémolytique

L'activité hémolytique est la capacité des isolats lactiques à provoquer la lyse des globules rouges chez l'hôte (Muryany *et al.*, 2017). Elle a été vérifiée après leur inoculation par stries sur la gélose BHI additionnée de 1 % (p/v) de glucose, 0,03 % d'arginine et 5 % (v/v) du sang humain qui était prélevé à partir d'une personne saine et mélangé aseptiquement avec le milieu autoclavé et refroidi. Après incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h en anaérobiose, les bactéries qui ne dégradent pas complètement les globules rouges (β . hémolytique) ont été sélectionnées (Birri *et al.*, 2013; Devi *et al.*, 2014).

III.2.3.2. Mise en évidence de la gélatinase

A partir des cultures bactériennes jeunes, des stries de 2 cm ont été déposées sur une gélose contenant la gélatine (Annexe 1). Après incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 à 48 h, une solution saturée de sulfate d'ammonium a été versée pour révéler la présence des zones claires autour des stries bactériennes qui reflètent la sécrétion de la gélatinase. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisé comme témoin positif (Ribeiro *et al.*, 2014).

III.2.3.3. Production de la DNase

La production de l'enzyme DNase par les bactéries présumées probiotiques a été mise en évidence sur des boîtes contenant une gélose à ADN. A partir des bouillons contenant des cultures bactériennes jeunes, des stries de 2 cm sont inoculées sur la surface sèche de la gélose. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h ; après leur inondation avec HCl (25%), l'apparition des zones claires autour des stries bactériennes indique une dégradation de l'ADN

par la DNase. La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin positif (Genta et Heluane, 2001).

III.2.3.4. Test de coagulase

La coagulase a été détectée selon la méthode décrite par De Almeida Júnior et al. (2015) :

1 mL de plasma humain a été mélangé avec 1 mL de chaque culture bactérienne. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 6 h et examinés pour une éventuelle formation d'un caillot ou d'une coagulation totale de plasma. Le tube contenant *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisé comme témoin positif.

III.2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité ou la résistance des souches présumées probiotiques aux antibiotiques ont été évaluées selon la méthode décrite par De Almeida Júnior et al. (2015).

18 disques d'antibiotiques ont été testés (Tab. 10) et la souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée pour contrôler leur qualité.

Tout d'abord, les souches lactiques sont cultivées sur le milieu MRS agar et incubées à 30 °C pendant 24 h. Ensuite, des colonies bactériennes de chaque souche sont transférées dans l'eau physiologique et leur DO sont ajustées à 0,5 Mc Farland. Ces suspensions bactériennes sont inoculées après dans des boîtes contenant la gélose MRS par écouvillonnage, puis les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface (à raison de 6 par boîtes). Après incubation des boîtes à 30 °C pendant 48 h, les zones d'inhibition ont été mesurées en incluant le diamètre du disque d'antibiotique (6 mm) dans la largeur de la zone.

Les résultats de 2 répétitions ont été exprimés en termes de résistance lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est : (≤ 15 mm), de sensibilité modérée : (16-20 mm) ou de sensibilité : (≥ 21 mm) (Vlková et al., 2006).

Tableau 10. Liste des antibiotiques utilisés pour évaluer la sensibilité des souches présumées probiotiques.

Antibiotiques	Symbole	Concentration	Antibiotiques	Symbole	Concentration
Nitroxoline	NO	30 µg	Acide fusidique	FA	10 µg
Céfoxitine	FOX	30 µg	Céfotaxime	CTX	30 µg
Céfazoline	CZ	30 µg	Oxytétracycline	OXT	30 UI
Rifampicine	R	5 µg	Acide Nalidixique	NA	30 µg
Chloramphénicole	C	30 unités/disc	Pénicillin G	P	10 UI
Oxacilline	OXA	5 µg	Colistine	CT	10 µg
Céfixime	CFM	5 µg	Amoxicilline	AMX	25 µg
Néomycine	NEO	30 UI	Ampicilline	AMP	10 µg
Thiamphénicole	THI	30 µg	Amikacine	AN	30µg

III.2.4. Caractérisation des souches probiotiques

Les souches lactiques présentant des propriétés probiotiques et qui sont dépourvues de caractères de virulence sont sélectionnées puis identifiées.

III.2.4.1. Identification phénotypique au stade genre

Pour déterminer le genre auquel appartient chaque souche probiotique, les critères décrits par Axelsson (2004) ont été suivis :

III.2.4.1.1. Examen macroscopique et microscopique

A l'aide d'une loupe binoculaire, on a déterminé les caractères culturels des colonies bactériennes bien isolées. La forme des bactéries, leur type de Gram ainsi que leur arrangement cellulaire ont été déterminés après la coloration de Gram et seulement les bactéries à Gram positif sont sélectionnées.

III.2.4.1.2. Caractérisation biochimique

III.2.4.1.2.1. Test de catalase

La production de la catalase par tous les isolats lactiques a été détectée par l'ajout de l'eau oxygénée à 10 V et seules les bactéries dénudées de la catalase ont été retenues.

III.2.4.1.2.2. Production du CO₂ à partir de glucose

Le caractère homo ou hétéro-fermentaire a été mis en évidence sur le bouillon MRS sans citrate (Annexe 1) distribué dans des tubes contenant des cloches de Durham. Après inoculation par les bactéries probiotiques et incubation pendant 5 jours à 30 °C, celles productrices du CO₂ sont des hétérofermentaires. Tandis que les bactéries qui ne produisent pas du CO₂ sont des homofermentaires (Björkroth et Holzapfel, 2006).

III.2.4.1.2.3. Production de NH₃ à partir de l'arginine

En utilisant des boîtes de Pétri contenant la gélose M16 BCP (Annexe 1), chaque souche probiotique a étéensemencée en spot puis incubée à 30 °C pendant 24 h. Si le milieu vire vers le violet, la souche hydrolyse l'arginine (ADH⁺) et lorsque le milieu vire vers le jaune, la souche ne peut pas hydrolyser l'arginine (ADH⁻) (Thomas, 1973).

III.2.4.1.2.4. Dégradation de l'esculine

A partir des cultures bactériennes jeunes, on aensemencé des tubes contenant le milieu bile esculine agar. Après incubation à 30 °C pendant 24 h, le noircissement du milieu indique une dégradation de l'esculine par l'esculinase produite par la souche probiotique (Badis et *al.*, 2005).

III.2.4.1.3. Caractérisation physiologique

III.2.4.1.3.1. Croissance à différentes températures

Toutes les souches bactériennes sontensemencées dans des tubes contenant 5 mL de bouillon MRS et incubées à 10 °C pendant 7 jours et d'autres à 45 °C pendant 48 h (khedid et *al.*, 2006).

III.2.4.1.3.2. Croissance à différentes concentrations d'NaCl

Dans des tubes contenant 5 mL de bouillon MRS additionné de 65 g/L et d'autres de 180 g/L d'NaCl, les bactéries sont inoculées puis incubées à 30 °C pendant 5 jours. La présence du trouble indique leur croissance.

III.2.4.1.3.3. Croissance aux pH 4,4 et 9,6

Dans des tubes contenant le bouillon MRS ajusté avec l'HCl à pH 4,4 ou à 9,6 en utilisant le NaOH (1 M), les souches probiotiques sont inoculées. Leur croissance a été suivie après une incubation à 30 °C pendant 48 h.

III.2.4.1.3.4. Thermorésistance

Des tubes à essai contenant 5 mL de bouillon MRS sont inoculés par chacune des bactéries probiotiques et placés dans un bain marie à une température de 60 °C pendant 30 min. Après une semaine d'incubation à 30 °C, l'apparition d'un trouble indique que la bactérie est thermorésistante (Badis et *al.*, 2005).

III.2.4.2. Identification moléculaire des souches probiotiques

L'identification moléculaire des souches probiotiques a été réalisée au niveau du laboratoire de biotechnologie de l'aquaculture, université Putra –Malaisie-

Pour amplifier le gène ARNr 16S qui sera ensuite séquencé puis analysé, une PCR directe sur colonies a été appliquée. Contrairement à celle standard, cette méthode ne nécessite pas l'extraction d'ADN purifié et elle est plus rapide et moins coûteuse. Elle vise à amplifier un gène spécifique d'une bactérie en plusieurs millions de copies, en utilisant des amorces s'hybridant seulement sur un gène recherché (Sebastião et *al.*, 2015).

III.2.4.2.1. Réactivation et centrifugation des cultures bactériennes

Les souches probiotiques conservées dans le bouillon MRS additionné de 30 % de glycérol ont été réactivées après inoculation des bouillons MRS puis incubation à 30 °C pendant 24 h.

Leur pureté a été vérifiée après ensemencement du milieu MRS agar par stries (30 °C-24 h). Quinz mL de chaque culture bactérienne sont centrifugées (6000 g, 4 °C) et le culot bactérien a été récupéré aseptiquement dans WFN.

III.2.4.2.2. Amplification de l'ARNr 16S par PCR et électrophorèse sur le gel d'agarose

✓ Amplification de l'ARNr 16S par PCR

Afin d'amplifier le gène d'ARNr 16S, l'ADN de chaque souche lactique n'a pas été extrait et la PCR a été directement employée sur les colonies bactériennes récupérées dans WFN comme mentionné précédemment. Pour cela, 2 amorces universelles ont été utilisées:

- 16S-27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- 16S-1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Un mélange réactionnel a été préparé pour un volume final de 25 μ L :

3 μ L le volume de chaque échantillon d'ADN et 22 μ L des autres constituants.

La composition détaillée du mélange réactionnel est montrée dans le tableau (11).

Tableau 11. Composition du mélange réactionnel (PCR).

Constituants	Volume (μ L)
d NTP (10 mM)	1
MgCl ₂ tampon (25mM)	2
Taq-polymérase	0,5
Echantillon d'ADN	3
5X Green Go Taq Flexi buffer (Promega)	5
Chaque type d'amorce	1
WFN	11,5

La réaction d'amplification de l'ARNr 16S par PCR a été déroulée dans un thermocycleur (Eppendorf nexus gradient) en suivant les étapes décrites par Gebreselassie et *al.* (2016) qui implique une:

- Dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 min,
- dénaturation: 29 cycles à 94 °C pendant 30 sec,
- hybridation à 55 °C pendant 30 sec,
- élongation à 72 °C pendant 30 min et
- étape finale d'élongation à 72 °C pendant 10 min.

✓ **Electrophorèse sur le gel d'agarose**

Un volume de 5 µL de chaque produit d'amplification d'ADN bactérien a été déposé dans le puit du gel d'agarose à 1 % (p/v) contenant 3 µL de bromure d'éthidium et des marqueurs de taille. La migration de l'ADN a été faite dans le tampon TAE (Tris-acétate-EDTA) pendant 40 min à 90 V. Le gel est visualisé sous la lumière UV pour repérer les bandes amplifiées.

III.2.4.2.3. Purification des produits PCR

La purification des produits PCR a été réalisée à l'aide du Kit de purification (GeneJET PCR), selon les instructions du protocole. Une électrophorèse des produits de purification a été faite pour confirmer son efficacité. Ensuite, l'ADN purifié a été conservé à -20 °C.

III.2.4.2.4. Séquençage du gène ARNr 16S

Les échantillons d'ADN purifiés sont séquencés au niveau des laboratoires de la 1^{ère} base, Malaisie. Les amorces utilisées pour le séquençage sont celles utilisées pour l'amplification du gène ARNr 16S. Les parties initiales et finales des séquences obtenues ont été supprimées par le logiciel Chromas Pro et que le fragment de haute qualité qui a été maintenu.

Après correction, les séquences ont été exportées au format FASTA et comparées avec celles du gène ARNr 16S disponibles dans la base de données GenBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> en utilisant le programme nBLAST.

La séquence du gène ARNr 16S de chaque souche bactérienne a été soumise au niveau du GenBank de NCBI pour obtenir un numéro d'accession.

III.2.4.2.5. Construction de l'arbre phylogénétique

En utilisant le logiciel Mega 7, les séquences des souches probiotiques sont alignées par ClustalW Progress et par le même logiciel l'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining (NJ). Le calcul des distances évolutives a été fait par la méthode de Kimura à 2 paramètres.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Isolement des bactéries lactiques

Avant d'isoler les bactéries lactiques, une étape d'enrichissement par fermentation spontanée a été nécessaire, car elles sont peu abondantes dans le lait de chamelle cru. Ceci peut être lié aux propriétés inhibitrices des facteurs antimicrobiens.

Kamoun (1995) a signalé que le lait de chamelle résiste à la croissance bactérienne, y compris la flore lactique dans les premières heures de son existence. Cette résistance présente un avantage certain à sa conservation mais devient un inconvénient lors de sa transformation. Toutefois, la prolongation du temps d'incubation compense le retard d'acidification traduit par une croissance de la flore lactique.

Zadi Karam et Karam (2006), Yateem *et al.* (2008), Abbas et Mahasneh (2014) ont également réalisé l'enrichissement des bactéries lactiques avant de les isoler du lait de chamelle.

Au total, 78 bactéries à Gram positif et catalase négative ont été isolées après ensemencement du lait fermenté et de leur dilution dans les milieux spécifiques d'isolement représentés par : MRS et M17. Ces bactéries sont présumées lactiques et pour sélectionner celles probiotiques, elles doivent répondre à certains critères (antagonisme, résistance aux conditions gastriques, pouvoir d'adhésion, etc.). Après réalisation de plusieurs tests sélectifs *in vitro*, seulement neuf souches ont été retenues et identifiées comme *Leuconostoc mesenteroides*.

III.3.2. Sélection des LAB avec des propriétés probiotiques

III.3.2.1. Activité antibactérienne des isolats lactiques contre les souches indicatrices

L'activité antimicrobienne est une propriété très importante dans la sélection des probiotiques, permettant ainsi la conservation des aliments et la prévention des infections gastro-intestinales (Champomier-Vergès *et al.*, 2010; Azat *et al.*, 2016).

Pour détecter l'activité antimicrobienne, plusieurs méthodes sont utilisées. En général, les tests d'antagonisme sont effectués sur des milieux solides et impliquent la détection de l'inhibition de la croissance d'une souche indicatrice causée par la culture d'essai (LAB). Les deux méthodes de base communément utilisées sont appelées les procédures d'antagonisme simultané (ou direct) et différé (Polak-Berecka *et al.*, 2009).

Pour tester l'antagonisme des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération des aliments, le test des spots sur agar a été appliqué. Ce test est le plus utilisé pour le dépistage des souches lactiques actives car il est simple et direct.

Les résultats de l'antagonisme montrent que la quasi-totalité des isolats lactiques représentant un pourcentage de 93,58 était active contre toutes les bactéries indicatrices à Gram + et à Gram – et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre (Fig. 9, 10 et 11).

Ce résultat confirme celui obtenu par Bouguerra (2012) qui a trouvé que toutes les souches lactiques du lait de chamelle fermenté sont actives contre 5 bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* ATCC: 25922, *Bacillus subtilis* et *Enterobacter cloacae*).

Le haut pourcentage des souches actives obtenu peut être expliqué par leur isolement après fermentation du lait de chamelle. Car selon Yateem et al. (2008), aucune étude ne suggère que le lait cru devrait être utilisé comme probiotique. De plus, certains chercheurs pensent à l'existence d'un effet synergique entre les composants des produits laitiers et les cultures probiotiques et que certains composants du lait activent les gènes bénéfiques des bactéries probiotiques. C'est le cas du lait de chamelle qui contient la PGRP jouant un rôle important dans l'immunité passive, après sa forte liaison aux LAB.

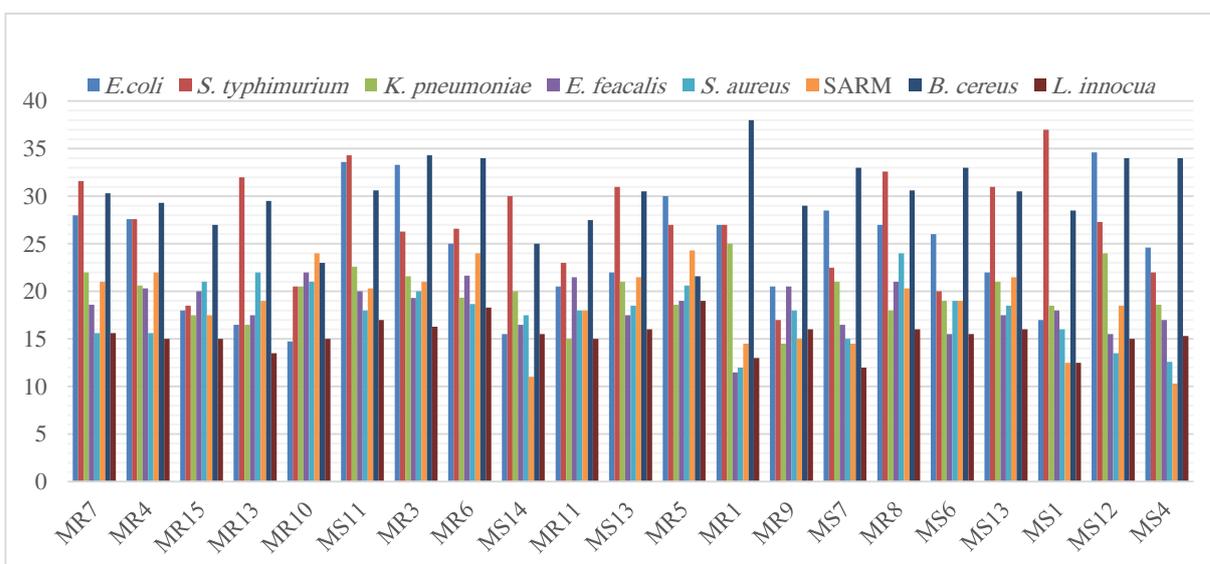


Figure 9. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de M'sila contre les souches indicatrices.

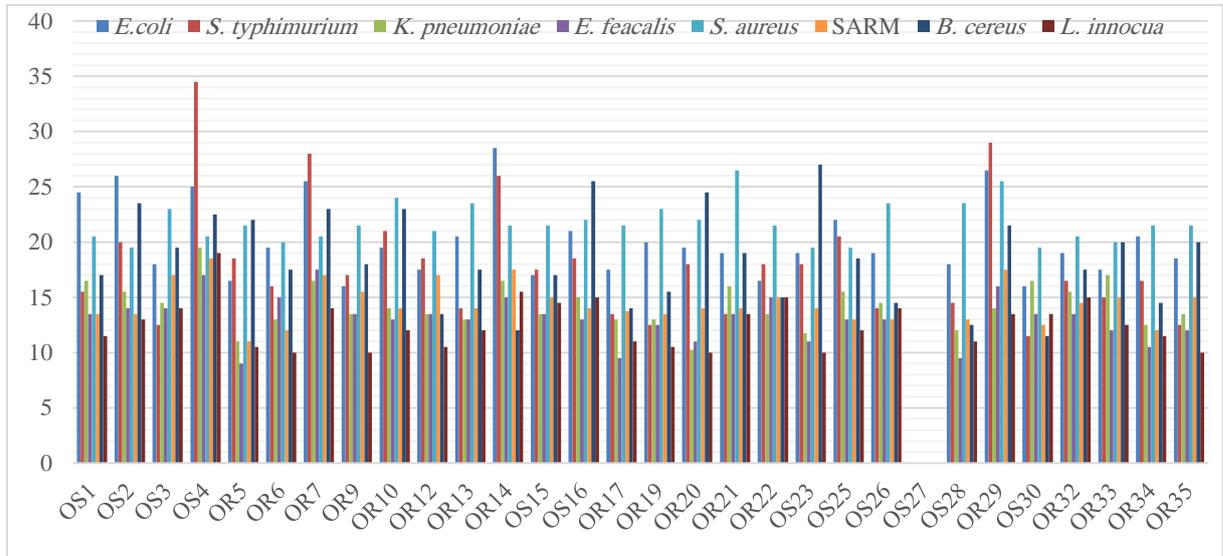


Figure 10. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de Oued Souf contre les souches indicatrices.

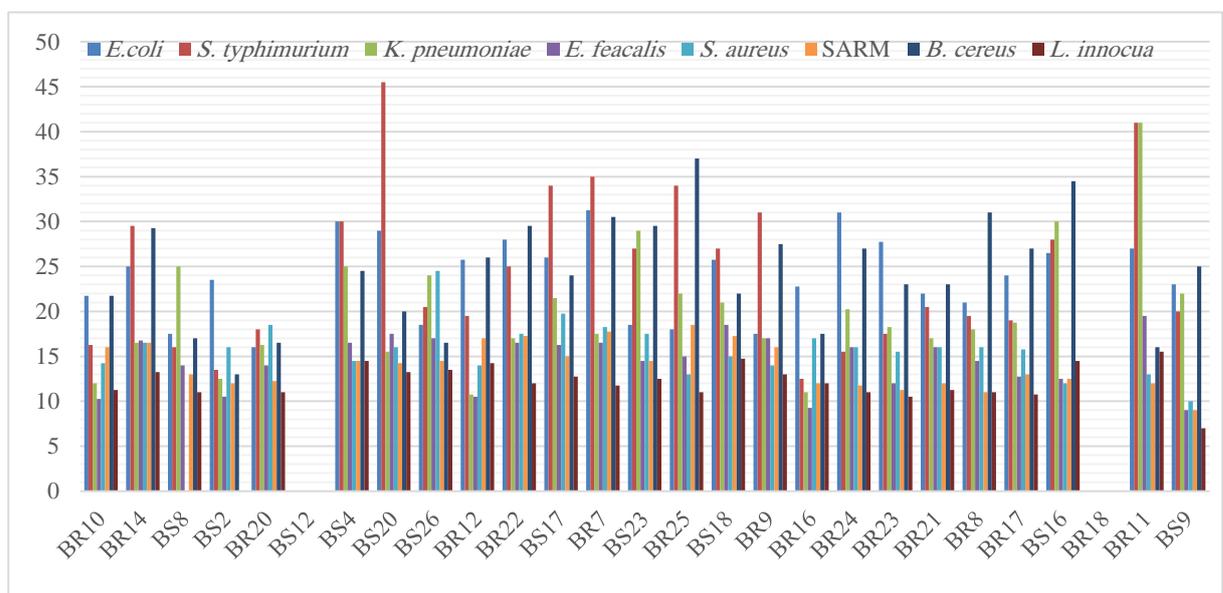


Figure 11. Diamètres d'inhibition (mm) obtenus par les souches lactiques isolées à partir de Biskra contre les souches indicatrices.

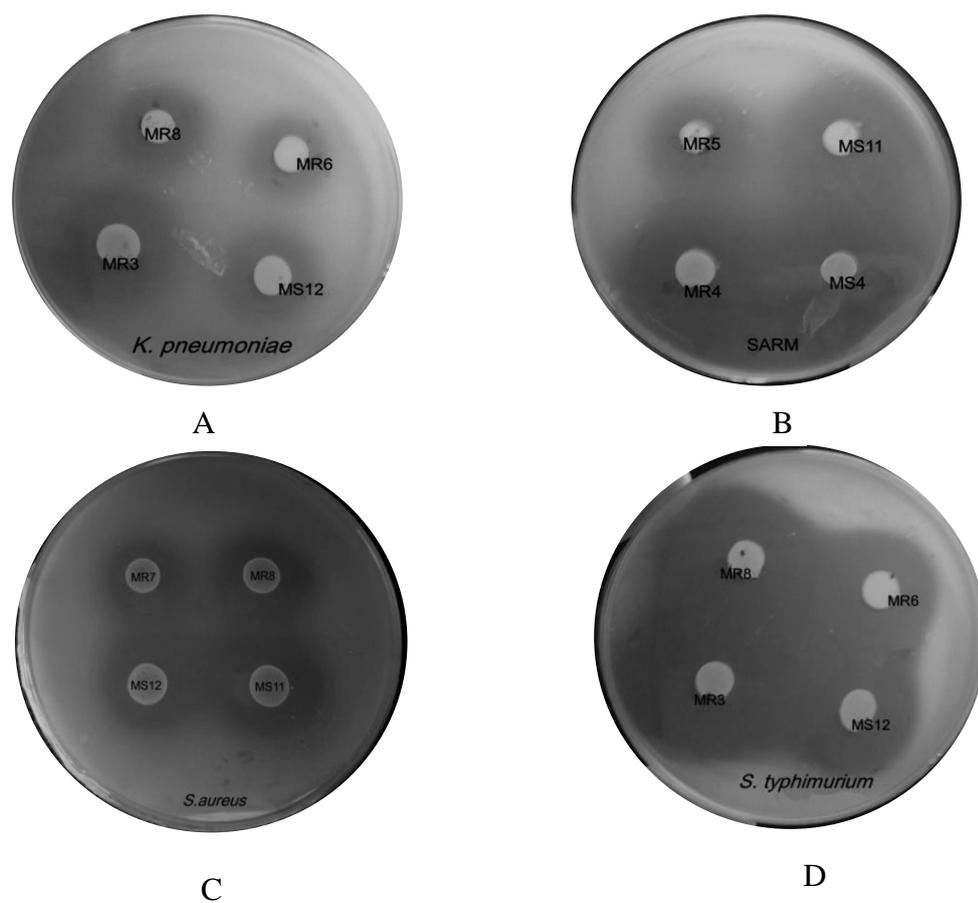


Figure 12. Activité antibactérienne de quelques isolats lactiques contre certaines souches pathogènes.

A : *K. pneumoniae*, B : SARM, C : *S. aureus*, D : *S. typhimurium*

3 souches lactiques BS12, BR18, OS27 ont été inactives contre toutes les bactéries pathogènes testées. Par ailleurs, les souches BS8 et BS2 ont été inactives vis-à-vis *S. aureus* et *L. innocua* respectivement. Ces 5 souches ne sont pas retenues dans les prochains tests d'étude du potentiel probiotique.

La meilleure inhibition a été obtenue contre *B. cereus* avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 22,80 mm \pm 8,062. Tandis que la flore lactique a faiblement inhibé *L. innocua* avec une moyenne de 12,56 mm \pm 3,72.

Dans plusieurs d'études menées sur l'activité antimicrobienne de la flore lactique du lait de chamelle, des souches actives contre des bactéries pathogènes et de détérioration des aliments ont été isolées. Davati et al. (2015) ont déterminé que la plupart des souches lactiques isolées du lait de chamelle peuvent inhiber *S. aureus*, *B. cereus* et *E. coli*.

Jrad et al. (2013) ont isolé 2 souches lactiques (BLC3 et BLC9) du lait camelin qui sont actives contre *Staphylococcus epidermidis* CIP 106510 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Abushelaibi et al. (2017) ont mentionné qu'à partir 23 isolats lactiques, 6 possèdent une forte activité vis-à-vis 4 bactéries pathogènes (*E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*) dont les meilleures zones d'inhibition ont été obtenues contre *S. aureus*.

Les propriétés inhibitrices des LAB sont principalement attribuées à la production d'acides organiques, en particulier les acides lactique et acétique, responsables de la diminution du pH. Ils affectent aussi l'intégrité de la membrane cellulaire compromettant la viabilité des cellules et conduisant dans de nombreux cas à leur lyse. Les LAB exercent également un effet bioprotecteur ou inhibiteur contre d'autres microorganismes en raison de la compétition pour les nutriments, ou en produisant une variété de substances antimicrobiennes entre autres, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, l'acide formique, l'acétoïne, le diacétyle et les bactériocines (Oliveira et al., 2008 ; Champomier-Vergès et al., 2010, Morandi et al., 2013).

L'inhibition de certaines bactéries pathogènes peut aussi être associée aux EPS secrétés par les souches productrices (Denkova et al., 2017).

En plus des facteurs antibactériens mentionnés ci-dessus, le genre *Leuconostoc* est capable d'inhiber les bactéries pathogènes aérobies en produisant du CO₂ qui crée un environnement anaérobie. L'accumulation du dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut nuire à sa perméabilité et inhiber les enzymes de décarboxylation (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

Bien que le mécanisme précis de l'action antimicrobienne soit difficile à élucider en raison d'interactions complexes et souvent synergiques entre différents composés, il a été démontré que les LAB inhibent les bactéries pathogènes à G⁺ et celles étroitement liées suite à l'effet bactéricide des bactériocines. En revanche, le contrôle de la croissance des bactéries pathogènes à G⁻, y compris les pathogènes alimentaires, se fait par la production d'acides organiques et de peroxyde d'hydrogène (Yateem et *al.*, 2008).

Bellil et *al.* (2014) ont caractérisé des substances actives contre *Listeria* produites par des souches *Leuconostoc* isolées du lait de chamelle cru comme des bactériocines appartenant à la classe II (petits peptides non modifiés, stables à la chaleur).

Chentouf et Benmechernene (2016) ont isolé sept souches de *Ln. mesenteroides* productrices des bactériocines qui inhibent la croissance des bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Lactobacillus plantarum*.

III.3.2.2. Propriétés adhésives

III.3.2.2.1. Hydrophobicité et auto-agrégation

Pour exercer leurs propriétés probiotiques, les LAB doivent être capables de s'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin et aux muqueuses. L'hydrophobicité et l'auto-agrégation sont deux caractéristiques qui peuvent être utilisées pour le dépistage préliminaire des probiotiques afin d'identifier les isolats potentiellement adhérents (Del Re et *al.*, 2000 ; Bautista-Gallego et *al.*, 2013).

L'hydrophobicité des LAB a été testée par une méthode basée sur les propriétés physicochimiques des surfaces bactériennes qui est l'adhésion aux hydrocarbures. Toutes les souches actives vis-à-vis les bactéries pathogènes ont été testées et on n'a retenu que neuf souches présentant des pourcentages ≥ 35 % (Blajman et *al.*, 2015).

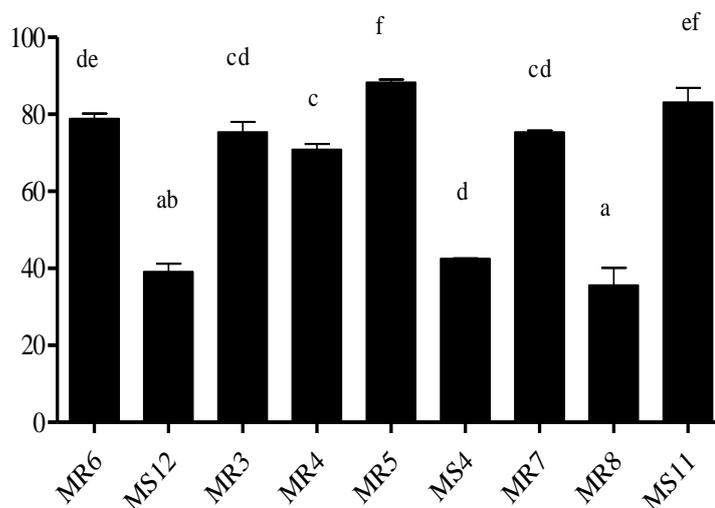


Figure 13. Pourcentages d'hydrophobicité des souches actives.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes des résultats de 3 répétitions
a, ab, c, cd, de, ef, f: Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (Anova).

Selon les résultats montrés dans la Fig.13, il s'avère que les souches MR5, MS11, MR6, MR3, MR7 et MR4 présentent des niveaux d'hydrophobicité élevés (>70 %). Par ailleurs, l'ensemble des souches MS4, MS12 et MR8 montre une hydrophobicité modérée avec des pourcentages de 42,57, 39,16 et 35,64 respectivement.

Bien que les souches ayant un pourcentage élevé d'hydrophobicité montrent une forte adhésion aux cellules épithéliales, les pourcentages modérés ne signifient pas que les souches sont faiblement adhérentes car l'adhésion implique également des groupes hydrophiles (Abdulla et *al.*, 2014 ; Blajman et *al.*, 2015).

L'auto-agrégation est l'un des facteurs clés qui détermine la capacité d'adhésion des souches probiotiques au TGI, à le coloniser et à moduler le système immunitaire (Ouwehand et Vesterlund, 2004; Abdulla et *al.*, 2014).

Selon les résultats obtenus (Fig.14), il apparait que toutes les souches bactériennes testées montrent des pourcentages d'auto-agrégation très élevés variant de (89,60 % et 99,95 %) représentés par les souches MR8 et MR5 respectivement.

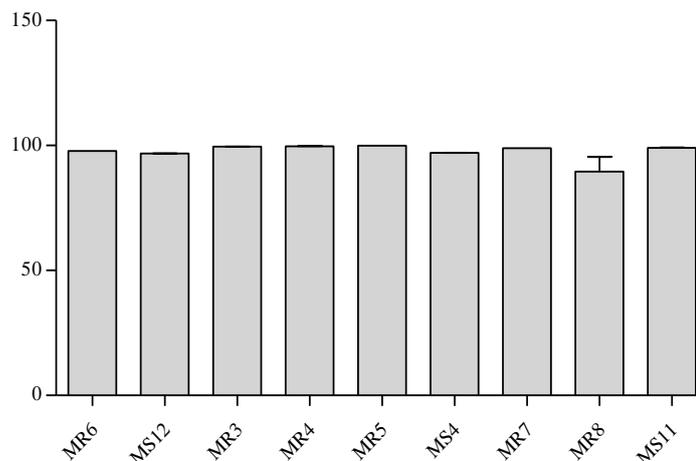


Figure 14. Pourcentages d'auto-agrégation des souches actives.

De Paula et *al.* (2014) ont également obtenu un pourcentage élevé (85,64) par une souche probiotique isolée à partir de l'eau du fromage mozzarella du buffle identifiée comme *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55. Par ailleurs, des taux plus faibles ont été obtenus par Nikolic et *al.* (2010) (33,28 %), Shukla et *al.* (2014) (55,2 %) et Sathyapriya et Anitha (2018) (14.2 %-38 %) en utilisant des souches de *Ln. mesenteroides*.

Selon Nikolic et *al.* (2010), l'agrégation des souches *Leuconostoc* peut être associée aux EPS produits ou à des facteurs protéiques. De plus, il est également possible que certains ions soient également impliqués dans l'agrégation. Ainsi, le lavage des cellules avec de l'eau distillée entraîne la perte de l'auto-agrégation de la majorité des souches testées.

III.3.2.2.2. Co-agrégation

Pour déterminer l'agrégation inter-bactérienne des souches lactiques, 2 souches pathogènes ont été choisies, une à Gram négatif (*E. coli*) et l'autre à Gram positif (*S. aureus*).

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 15 et 16 respectivement.

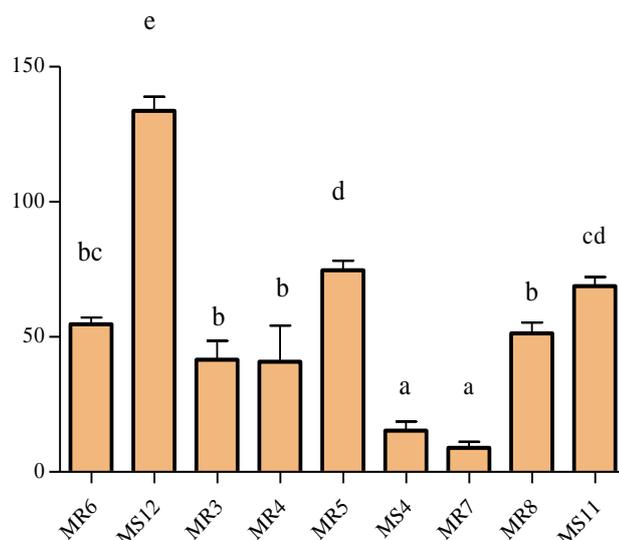


Figure 15. Pourcentages de co-agrégation obtenus par les souches actives contre *E. coli*.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes des résultats de 3 répétitions, a, b, bc, cd, e; Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (Anova).

D'après la Fig. 15, il apparaît que la souche MS12 possède le pourcentage le plus élevé de co-agrégation contre *Escherichia coli* qui est de : 133,64. Tandis que les souches MS4 et MR7 avaient les plus faibles pourcentages de : 15,27 et 8,98 respectivement. Les souches restantes : MR3, MR4, MR6, MR8, MR5 et MS11 ont des pourcentages de co-agrégation moyens qui varient de (40,85 et 74,67).

Choi et al. (2018) ont rapporté un pourcentage de 47,6 après 24 h d'incubation de la souche *Ln. mesenteroides* KCCM 43060 contre *E. coli* O157: H7 ATCC 35150.

Zhang et al. (2013) ont trouvé un faible pourcentage de co-agrégation de la souche *Ln. lactis* contre *E. coli* O157 qui est de 10,74 proche de celui obtenu par la souche MR7.

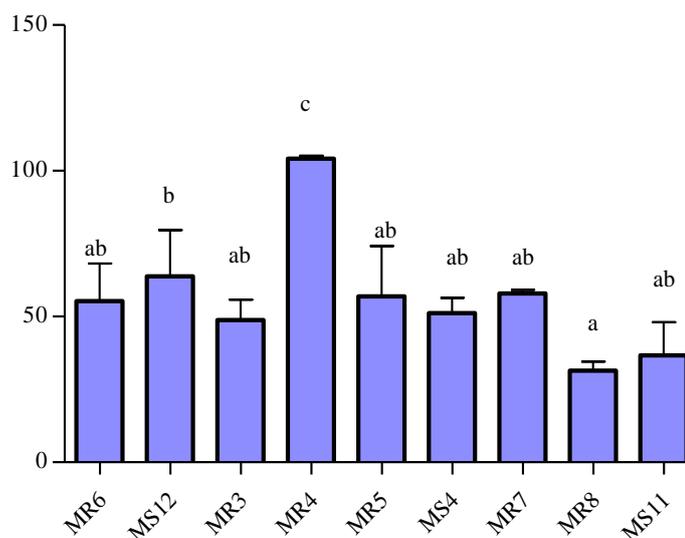


Figure 16. Pourcentages de co-agrégations obtenus par les souches actives contre *Staphylococcus aureus*.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes des résultats de 3 répétitions, ^{a, ab, b, c}: Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (Anova).

D'après les résultats obtenus (Fig. 16), il s'avère que la souche MR4 a montré le meilleur pourcentage contre *Staphylococcus aureus* de: 104,21 suivi par la souche MS12 (63,78). Tandis que la souche MR8 avait le pourcentage le plus faible (31,45). Ce dernier est inférieur à celui rapporté par Choi et *al.* (2018) (40,2 %), après 24 h d'incubation de la souche *Ln. mesenteroides* KCCM 43060 avec *S. aureus* KCCM 11335, et supérieur à celui trouvé par Zhang et *al.* (2013) (24,41 %) de la souche *Ln. lactis* contre *S. aureus*. Concernant les autres souches, il n'existe pas une différence significative entre les valeurs de co-agrégation obtenues.

La co-agrégation avec des agents pathogènes intestinaux peut être utile pour le dépistage des souches avec un potentiel probiotique. Elle constitue un mécanisme important de défense de l'hôte contre les infections après formation d'une barrière qui empêche la colonisation par des microorganismes pathogènes (Abdulla et *al.*, 2014 ; Sathyapriya et Anitha, 2018). Ainsi, les probiotiques capables de se co-agréger efficacement avec les agents pathogènes vont exercer une action inhibitrice et bactéricide contre ceux après production des composés antimicrobiens citant par exemple : l'acide lactique, H_2O_2 et peptides antimicrobiens (bactériocines), etc. (Gupta et Sharma, 2017).

Les structures responsables de l'agrégation inter-bactérienne ne sont pas bien élucidées. Cependant, l'exposition des cellules bactériennes à la chaleur et aux attaques protéolytiques

conduit à une perte de la capacité de co-agrégation. Par conséquent, les protéines sont considérées comme des médiateurs dans le processus de co-agrégation (Vandevoorde et al., 1992).

Les hauts pourcentages de co-agrégation obtenus par les souches MS12 contre *Escherichia coli* et MR4 contre *Staphylococcus aureus* montrent leur efficacité dans la prévention vis-à-vis de la colonisation de l'organisme par ces pathogènes d'origine alimentaire.

III.3.2.3. Résistance à l'acidité et aux sels biliaires

Toutes les souches lactiques testées n'ont pas pu se développer à un pH 2. Par ailleurs, selon le Tab. 12, elles ont montré une résistance significative au pH 3 après 3 h d'incubation avec un taux de survie variant entre (75,31 %-115,85 %) par rapport à celui optimum 6,2 (96,73 %-

Tableau 12. Taux de survie des neuf souches lactiques à l'acidité.

Souches	pH 3,0			pH 6,2		
	Nombre de bactéries viables à 0h (Log UFC/mL)	Nombre de bactéries viables après 3 h (Log UFC/mL)	Taux de survie (%)	Nombre de bactéries viables à 0h (Log UFC/mL)	Nombre de bactéries viables après 3 h (Log UFC/mL)	Taux de survie (%)
MR6	8,58±0,01 ^b	8,49±0,08 ^{cd}	98,89±1,12 ^{bc}	8,62±0,09 ^c	8,44±0,03 ^a	97,82±0,66 ^a
MS12	7,82±0,4 ^a	7,95±0,5 ^{bc}	101,93±9,20 ^c	7,99±0,29 ^{ab}	8,38±0,001 ^a	104,89±3,9 ^{ab}
MR3	8,62±0,15 ^b	8,53±0,13 ^{cd}	98,93±1,41 ^{bc}	8,44±0,08 ^{bc}	8,52±0,01 ^a	100,87±0,81 ^{ab}
MR4	7,64±0,01 ^a	8,85±0,05 ^d	115,85±1,44 ^d	7,83±0,38 ^a	8,54±0,25 ^a	109,35±7,89 ^b
MR5	8,82±0,04 ^b	8,55±0,09 ^{cd}	96,96±1,02 ^{bc}	8,80±0,14 ^c	8,51±0,29 ^a	96,73±4,77 ^a
MS4	8,36±0,16 ^b	8,43±0,2 ^{cd}	100,84±0,73 ^c	8,36±0,1 ^c	8,18±0,04 ^a	97,86±0,94 ^a
MR7	8,40±0,13 ^b	6,33±0,3 ^a	75,31±2,66 ^a	8,58±0,04 ^c	8,43±0,13 ^a	98,16±1,23 ^a
MR8	8,44±0,07 ^b	7,47±0,3 ^b	88,58±3,45 ^b	8,41±0,24 ^{bc}	8,26±0,06 ^a	98,30±3,31 ^a
MS11	7,83±0,21 ^a	8,24±0,1 ^{cd}	105,25±4,16 ^{cd}	8,29±0,06 ^{ac}	8,41±0,05 ^a	101,45±1,34 ^{ab}

Les comptages des bactéries viables sont présentés comme la moyenne±SD de 3 répétitions. Les valeurs avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes (P<0,05) (Anova).

104,89 %).

Pendant la transformation des aliments, les bactéries probiotiques passent par l'estomac avant d'atteindre l'intestin grêle. Une perte de viabilité peut survenir à la suite d'une exposition à l'acide gastrique et à l'activité protéolytique de la pepsine dans l'estomac (Muller et al., 2009).

Le pH 2 était létal pour toutes les souches. Des résultats similaires ont été obtenus par Benyoucef *et al.* (2017). Cependant, Benmechernene *et al.* (2013) ont isolé des souches de *Ln. mesenteroides* résistantes au pH 2.

Bien que le pH stomacal fluctue entre (1,5 et 6), le pH 3 est souvent considéré comme optimal pour la sélection des probiotiques (Muller *et al.*, 2009 ; Azat *et al.*, 2016). En comparant au pH optimum pour la croissance des LAB (6,2), le pH 3 n'a pas un effet significatif sur la viabilité de la plupart des souches. Par conséquent, les souches lactiques testées sont considérées comme acidotolérantes. Cette résistance peut être associée à l'effet protecteur des EPS produits par les cellules (Denkova *et al.*, 2017).

Dans l'intestin grêle, les sels biliaires présentent un autre défi pour la viabilité des bactéries lactiques en endommageant leur membrane et en produisant des lésions dans l'ADN. Il est donc nécessaire d'évaluer leur tolérance aux sels biliaires avant de les employer comme probiotiques (Kacem et Karam, 2006a ; Champomier-Vergès, 2010).

Dans cette étude, on a choisi les concentrations 0,3 % et 0,5 % des sels biliaires car les concentrations physiologiques de la bile humaine se situent entre ces 2 valeurs (Zavaglia *et al.*, 1998 ; Shukla *et al.*, 2014).

Tableau 13. Taux de survie des neuf souches lactiques aux sels biliaires.

Souches	0,3 % de sels biliaires			0,5 % de sels biliaires		
	Nombre de bactéries viables à 0h (Log UFC/mL)	Nombre de bactéries viables après 4 h (Log UFC/mL)	Taux de survie (%)	Nombre de bactéries viables à 0h (Log UFC/mL)	Nombre de bactéries viables après 4 h (Log UFC/mL)	Taux de survie (%)
MR6	8,45±0,08 ^g	6,35±0,11 ^d	75,23±2,08 ^b	7,27±0,08 ^d	5,76±0,17 ^d	79,33±3,05 ^{bc}
MS12	6,92±0,07 ^{cd}	5,22±0,12 ^c	75,57±1,60 ^b	6,51±0,06 ^c	5,38±0,04 ^d	82,64±1,41 ^{bc}
MR3	7,02±0,02 ^d	5,18±0,18 ^c	73,81±2,63 ^b	5,94±0,05 ^{bc}	3,67±0,18 ^a	61,78±2,53 ^a
MR4	7,11±0,005 ^{de}	4,78±0,03 ^b	67,31±0,51 ^a	5,66±0,07 ^b	4,27±0,06 ^{bc}	75,41±1,46 ^b
MR5	7,28±0,04 ^e	6,28±0,03 ^d	86,30±0,90 ^c	7,43±0,15 ^d	3,88±0,16 ^{ab}	52,29±2,70 ^a
MS4	5,95±0,04 ^b	4,19±0,07 ^a	70,36±1,28 ^{ab}	4,36±0,01 ^a	4,00±0,06 ^{ab}	91,67±1,51 ^{cd}
MR7	8,06±0,08 ^f	7,13±0,09 ^e	88,58±2,06 ^c	7,69±0,57 ^d	7,57±0,02 ^e	98,76±7,77 ^d
MR8	5,54±0,13 ^a	5,08±0,18 ^{bc}	91,87±4,51 ^c	5,79±0,41 ^b	4,65±0,22 ^c	80,71±8,85 ^{bc}
MS11	6,72±0,13 ^c	4,79±0,02 ^b	71,41±1,09 ^{ab}	5,50±0,02 ^b	4,19±0,12 ^b	76,20±2,70 ^b

Les comptages des bactéries viables sont présentés comme la moyenne±SD de 3 répétitions.

Les valeurs avec différentes lettres dans la même colonne sont significativement différentes (P<0,05) (Anova).

Selon le Tab. 13, il s'avère que toutes les souches ont une bonne tolérance aux sels biliaries, aussi bien dans 0,3 % que dans 0,5 % des sels biliaries après 4 h. Cependant, la souche MR5 est plus affectée par l'augmentation de la concentration des sels biliaries.

Toutes les souches ont survécu à 0,3 % avec des pourcentages élevés entre (67,31 et 91,87) et la plupart d'entre elles ont montré une amélioration du taux de survie dans 0,5 % des sels biliaries malgré la diminution brusque du nombre des bactéries initial.

La tolérance de *Ln. mesenteroides* aux sels biliaries a également été signalée par plusieurs auteurs dans des études antérieures (Allameh et al., 2012 ; Benmechernene et al., 2013 ; De Paula et al., 2014 ; Shukla et al., 2014 ; Diana et al., 2015). Elle est liée à une enzyme (BSH) qui aide à hydrolyser la bile conjuguée, réduisant ainsi son effet toxique (Iyer et al., 2011).

III.3.2.4. Résistance à 0,4 % de phénols

Pour qu'une souche soit probiotique, elle doit survivre à l'action des métabolites toxiques, principalement les phénols, produits au cours du processus de digestion. Certains acides aminés aromatiques dérivés des protéines alimentaires ou produites de manière endogène peuvent être désaminés dans l'intestin par les bactéries en phénols. Ces derniers exercent un effet bactériostatique contre certaines souches probiotiques (Shehata et al., 2016 ; Choudhary et al., 2018).

Selon les résultats obtenus (Tab.14) et après 24 h d'incubation dans le bouillon MRS additionné de 0,4 % de phénol, toutes les souches sont inhibées différemment. Ainsi, les souches MR6, MS12, MR4 et MS11 ont été inhibées complètement. Par ailleurs, la viabilité des autres souches a été affectée avec diminution de 2 à 3 Log 10.

D'après les travaux précédents, la tolérance des LAB aux phénols est variable. Vizoso-Pinto et al. (2006) ont signalé une tolérance à 0,4 % de phénols chez 4 isolats de *Lactobacillus* sur 10 après incubation pendant 24 h. Néanmoins, aucun isolat n'a pu se développer en présence de phénols pendant cette période d'incubation.

Ghita et al. (2015) ont testé 10 souches bactériennes pour leur tolérance à 0,4 % de phénols et ont constaté que la souche *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B-512f était la plus résistante.

Shehata et *al.* (2016) ont étudié l'effet de 2 concentrations différentes de phénols (0,2 % et 0,5 %) sur la croissance de neuf isolats LAB après 24 heures d'incubation. Ces isolats lactiques examinés ont montré différents degrés de sensibilité à différentes concentrations de phénols avec un pourcentage de croissance relatif variable compris entre 15,1 et 21,7.

Tableau 14. Résistance des souches lactiques à 0,4 % de phénols.

Strains	Nombre de bactéries viables (Log ₁₀ UFC/mL) ^a					
	MRS+Phénol			MRS bouillon (contrôle)		
	0h	24 h	Augmentation ^b	0h	24 h	Augmentation ^b
MR6	4,46±0,15 ^a	00 ^a	-4,46	6,42±0,091 ^a	9,02±0,018 ^{de}	2,60
MS12	6,14±0,08 ^d	00 ^a	-6,14	6,39±0,185 ^a	8,32±0,24 ^{bc}	1,93
MR3	6,57±0,14 ^e	3,45±0,07 ^c	-3,12	6,82±0,105 ^a	9,03±0,056 ^{de}	2,21
MR4	5,11±0,11 ^b	00 ^a	-5,11	6,43±0,07 ^a	7,49±0,19 ^a	1,05
MR5	6,33±0,008 ^{de}	3,76±0,08 ^d	-2,57	6,50±0,06 ^a	7,64±0,06 ^{cd}	1,14
MS4	6,25±0,09 ^{de}	3,00±0,04 ^b	-3,25	6,42±0,071 ^a	8,20±0,18 ^b	1,78
MR7	6,43±0,11 ^{de}	3,02±0,012 ^b	-3,41	6,39±0,618 ^a	9,10±0,17 ^e	2,70
MR8	5,68±0,10 ^c	3,43±0,092 ^c	-2,25	6,39±0,185 ^a	8,65±0,034 ^{cd}	2,26
MS11	4,15±0,15 ^a	00 ^a	-4,15	6,80±0,03 ^a	8,54±0,04 ^{bc}	1,73

^aLog moyenne des comptes de 3 répétitions (moyenne±sd).

Les valeurs avec différentes lettres dans la même colonne sont significativement différentes (P<0,05) (Anova).

^b Augmentation=Log₁₀ (population finale)-Log₁₀ (population initiale).

III.3.3. Innocuité des souches sélectionnées

III.3.3.1. Activité hémolytique

Pour assurer l'absence du pouvoir pathogène et d'infection d'un probiotique, son activité hémolytique doit être vérifiée (El-Jeni et al., 2016).

Les résultats obtenus montrent qu'aucune des souches de *Ln. mesenteroides* examinées n'a présenté une activité β . hémolytique (zone claire autour de la colonie bactérienne) lorsqu'elles ont été cultivées dans une gélose au sang. Toutes les souches étaient α . hémolytiques (zone verte autour de la colonie bactérienne) (Fig. 17) considérées comme non hémolytiques (Rather et al., 2015, Maragkoudakis et al., 2009).

Mokdad et al. (2020) et Benmechernene et al. (2013) ont également isolé des souches de *Leuconotoc mesenteroides* à partir du lait de chamelle et de chèvre exemptes du caractère hémolytique.

Selon Holzapfel et al. (2009), *Ln. mesenteroides* n'est pas une espèce hémolytique. En outre, il a été mentionné qu'à l'exception de certaines souches d'*E. faecalis*, l'hémolyse est rarement rencontrée chez les bactéries lactiques d'origine alimentaire (Maragkoudakis et al., 2009).

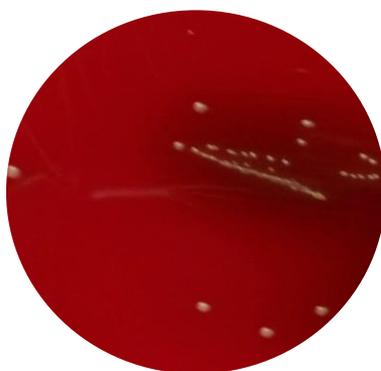


Figure 177. Aspect des colonies bactériennes sur la gélose au sang.

III.3.3.2. Production de la gélatinase

Cette enzyme joue également un rôle important dans la pathogénicité car c'est une protéase impliquée dans l'hydrolyse de la gélatine, de la caséine, du collagène et de l'hémoglobine, etc. (Moraes et al., 2012).

Après développement des souches lactiques sur la gélose contenant la gélatine, puis révélation par une solution saturée de sulfate d'ammonium aucune souche n'a pu la dégrader. Ceci concorde avec le résultat obtenu par Mokdad et *al.* (2020).

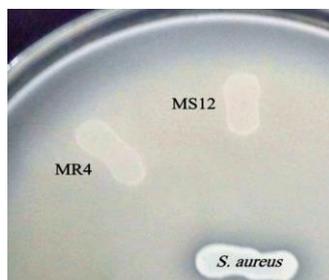


Figure 18. Détection de la gélatinase chez certaines souches présumées probiotiques.

III.3.9.3. Production de DNase

Les souches lactiques et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont développées sur une gélose à ADN. Après inondation des boîtes de Pétri avec HCl, aucune souche lactique n'a pu dégrader l'ADN. Le résultat obtenu concorde avec celui obtenu par Mokdad et *al.* (2020).

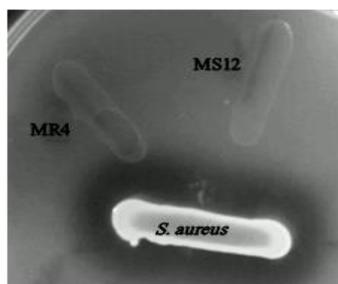


Figure 189. Détection de DNase chez certaines souches présumées probiotiques.

III.3.3.4. Test de coagulase

Ce test permet de détecter la coagulase libérée par la bactérie qui agit sur la prothrombine pour produire une thrombine-like. Cette dernière transforme le fibrinogène en fibrine. Après inoculation du plasma humain avec les neuf souches lactiques et incubation pendant 6 h à 37 °C, aucune souche n'a pu la coaguler soit totalement ou partiellement.

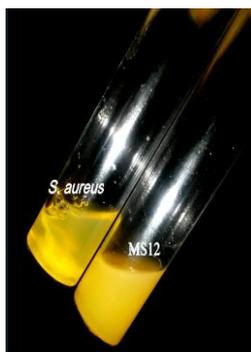


Figure 20. Résultat du test de coagulase.

III.3.3.5. Sensibilité aux antibiotiques

Les exigences en matière d'évaluation de la sécurité des souches LAB présentant un intérêt technologique doivent inclure la caractérisation du profil de résistance/sensibilité aux antibiotiques (Fraqueza, 2015).

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens peuvent être effectués à l'aide de différentes méthodes phénotypiques. Dans cette étude, les souches lactiques sélectionnées ont été testées en utilisant la méthode de diffusion sur gélose standardisée. Pour cela, 18 antibiotiques ont été utilisés.

Les résultats de 4 antibiotiques ont été écartés (néomycine, thiamphénicole, ampicilline et amikacine) après comparaison avec l'antibiogramme d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

Les 14 antibiotiques retenus sont répartis sur différents groupes selon leur mode d'action, il s'agit des :

- Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (amoxicilline, pénicilline G, oxacilline, céfotaxime, céfexime, céfoxitine et céfazoline),
- Inhibiteurs de la synthèse des protéines (chloramphénicol, oxytétracycline et acide fusidique),
- Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques bactériens (nitroxoline, rifampicine et acide nalidixique)
- Antibiotiques qui affectent la perméabilité de la membrane cellulaire (colistine).

Les diamètres des zones d'inhibition en (mm) des antibiotiques contre les souches probiotiques sont indiqués dans le Tab.15.

Les résultats montrent que toutes les souches ont résisté à 5 antibiotiques : acides nalidixique et fusidique, colistine, céfixime et oxacilline. Cependant, elles étaient toutes sensibles à la nitroxoline, au chloramphénicol, au céfotaxime, à l'amoxicilline et à la pénicilline G.

De plus, toutes les souches étaient sensibles à la céfazoline sauf MS4, MR7 et MR8 qui sont modérément sensibles. A l'exception de MR4 et MR7 qui sont résistantes à la rifampicine, le reste des souches étaient sensibles. Pour la céfoxitine, 3 souches sont modérément sensibles (MR3, MR5 et MR7), une souche résistante (MS4) et les autres sont sensibles.

Les aliments fermentés peuvent servir de véhicule pour introduire un grand nombre de bactéries non pathogènes résistantes aux antibiotiques dans le TGI humain. Ces bactéries peuvent interagir avec la microflore intestinale et disséminer des gènes résistants aux antibiotiques (Gevers et *al.*, 2003).

Des rapports ont signalé que les souches de *Leuconostoc* présentent une faible, voire aucune, résistance aux antibiotiques d'intérêt clinique (Ogier et Serror, 2008). D'après les résultats obtenus (Tab. 15), toutes les souches lactiques testées sont sensibles à la plupart des antibiotiques.

A l'exception du céfixime, presque toutes les souches sont sensibles aux céphalosporines (céfoxitine, céfazoline et céfotaxime). Elles sont également sensibles à la pénicilline, à l'amoxicilline mais résistantes à l'oxacilline. Selon Morandi et *al.* (2013), les bactéries lactiques d'origine alimentaire sont sensibles à la pénicilline et aux céphalosporines, mais très résistantes à l'oxacilline.

Des résultats similaires ont été obtenus par Zarour et *al.* (2013) et Zdolec et *al.* (2011) concernant la résistance des leuconostocs aux acides fusidique, nalidixique et à la colistine. En plus de la sensibilité de la plupart des souches à la rifampicine et aux tétracyclines (oxytétracyclines utilisées dans cette étude).

Les résultats d'évaluation de l'innocuité des souches testées montrent qu'elles sont dépourvues de la β . hemolysine, la gélatinase, la DNase et la coagulase. Elles sont sensibles à la plupart des antibiotiques. Ceci indique la possibilité de leur utilisation sans danger dans les préparations alimentaires. De Paula et *al.* (2014) ont mentionné qu'aucun cas d'infection suite à la consommation des produits laitiers contenant des *Leuconostoc* spp. n'a été signalé, ce qui démontre leur innocuité.

Tableau 15. Antibiogramme des souches lactiques sélectionnées.

ATB	MR6	MS12	MR3	MR4	MR5	MS4	MR7	MR8	MS11
NO	31(S)	36.5(S)	39(S)	36,5(S)	39(S)	32(S)	36,5(S)	33(S)	35(S)
FOX	22(S)	24(S)	19,5(MS)	26(S)	16(MS)	12.5(R)	17,5(MS)	22(S)	22,5(S)
CZ	21,5(S)	27(S)	23,5(S)	20(S)	22(S)	19,5(MS)	21(MS)	21(MS)	25,5(S)
R	22,5(S)	24,5(S)	29(S)	14(R)	27,5(S)	27(S)	14(R)	24(S)	23,5(S)
C	33(S)	40(S)	42(S)	44(S)	43(S)	41(S)	44(S)	33(S)	40(S)
OXA	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
CFM	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
FA	00(R)	11(R)	15,5(R)	11,5(R)	12(R)	00(R)	00(R)	12(R)	00(R)
CTX	28(S)	36(S)	31(S)	38(S)	32(S)	35(S)	30,5(S)	32(S)	32(S)
OXT	23(S)	29,5(S)	32(S)	30(S)	30(S)	29,5(S)	30(S)	29(S)	23,5(S)
NA	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
P	31(S)	36(S)	39(S)	43(S)	36(S)	43(S)	37(S)	33(S)	34(S)
CT	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
AMX	21(S)	27,5(S)	24(S)	27,5(S)	24,5(S)	29,5(S)	23,5(S)	26,5(S)	21,5(S)

S : sensible, MS : modérément sensible, R : résistante

NO : Nitroxoline, FOX : Céfoxitine, CZ : Céfazoline, R : Rifampicine, C : Chloramphénicole, OXA : Oxacilline, CFM : Céfixime, NEO : Néomycine, THI : Thiamphénicole, FA : Acide fusidique, CTX : Céfotaxime, OXT : Oxytétracycline, NA : Acide nalidixique, P : Pénicilline G, CT : Colistine, AMX : Amoxicilline, AMP : Ampicilline, AN : Amikacine.

Parties grisées : résistance aux antibiotiques

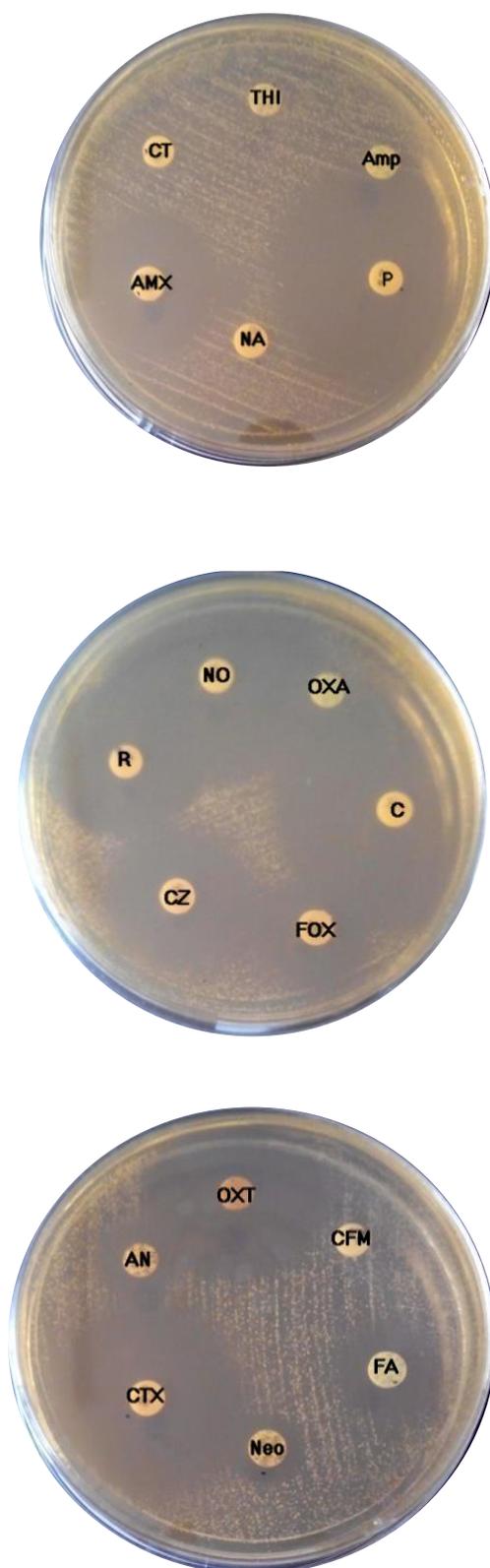


Figure 21. Antibiogramme de la souche MR3.

III.3.2.4. ACP des propriétés probiotiques des souches lactiques

En se basant sur leurs propriétés probiotiques, les neuf souches lactiques isolées du lait de chamelle ont été classées en groupes après analyse en composantes principales (ACP) des variables suivantes : activité antibactérienne contre *E. coli*, activité antibactérienne contre *S. aureus*, hydrophobicité, auto-agrégation, co-agrégation avec *E.coli*, co-agrégation avec *S. aureus*, la tolérance à l'acidité (pH 3), la tolérance aux sels biliaires (0,3 %).

Les valeurs propres de la matrice des corrélations obtenues pour cette analyse (ACP) comme combinaisons linéaires des variables de départ sont montrées dans la Fig. 22. En utilisant les isolats comme variables de regroupement, seules 4 valeurs propres supérieures à 1 ont été obtenues. 2 axes sont sélectionnés qui sont les facteurs F1 (34,51 %) et F2 (24,60 %) cumulés en 59,11 % de la variance.

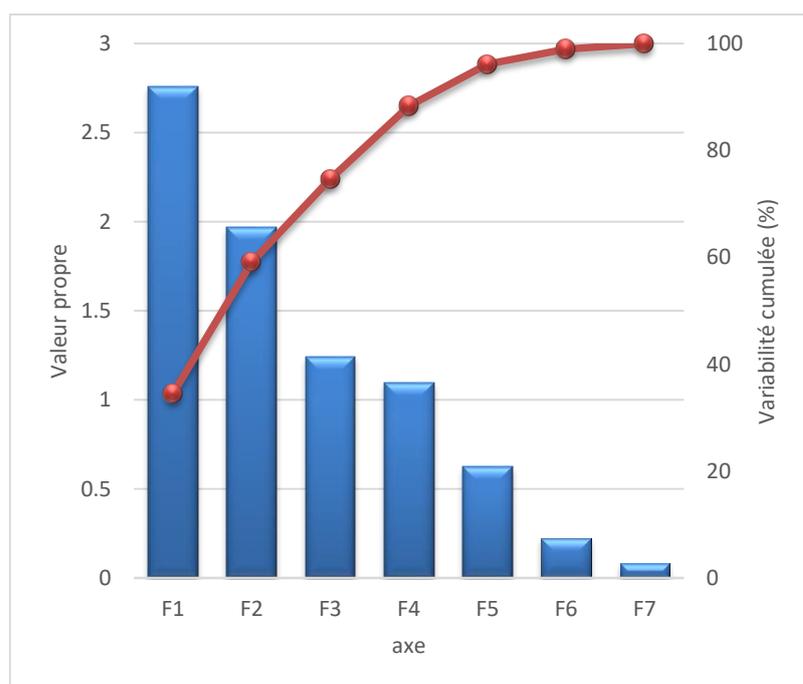


Figure 22. Représentation graphique des valeurs propres de la matrice de corrélation.

L'étude de la contribution des variables aux facteurs (Tab. 16) a montré que le facteur 1 (qui explique 34,51 % de la variance) était principalement lié à la tolérance à l'acidité, aux sels biliaires et à la co-agrégation avec *S. aureus*. Le facteur 2 (24,60 %) est lié à l'auto-agrégation, la co-agrégation avec *E. coli*, l'antagonisme vis-à-vis de *E. coli* et *S. aureus*.

Tableau 16. Contribution des variables aux facteurs dans l'ACP basée sur la corrélation.

	F1	F2	F3	F4
Acidité	0,876	0,001	0,035	0,010
Sels biliaires	0,664	0,151	0,004	0,019
Auto-aggrégation	0,279	0,372	0,184	0,140
Hydrophobicité	0,003	0,001	0,331	0,626
Co <i>E. coli</i>	0,217	0,504	0,151	0,000
Co <i>S. aureus</i>	0,420	0,160	0,071	0,006
<i>E. coli</i>	0,107	0,329	0,189	0,294
<i>S. aureus</i>	0,194	0,450	0,276	0,001

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

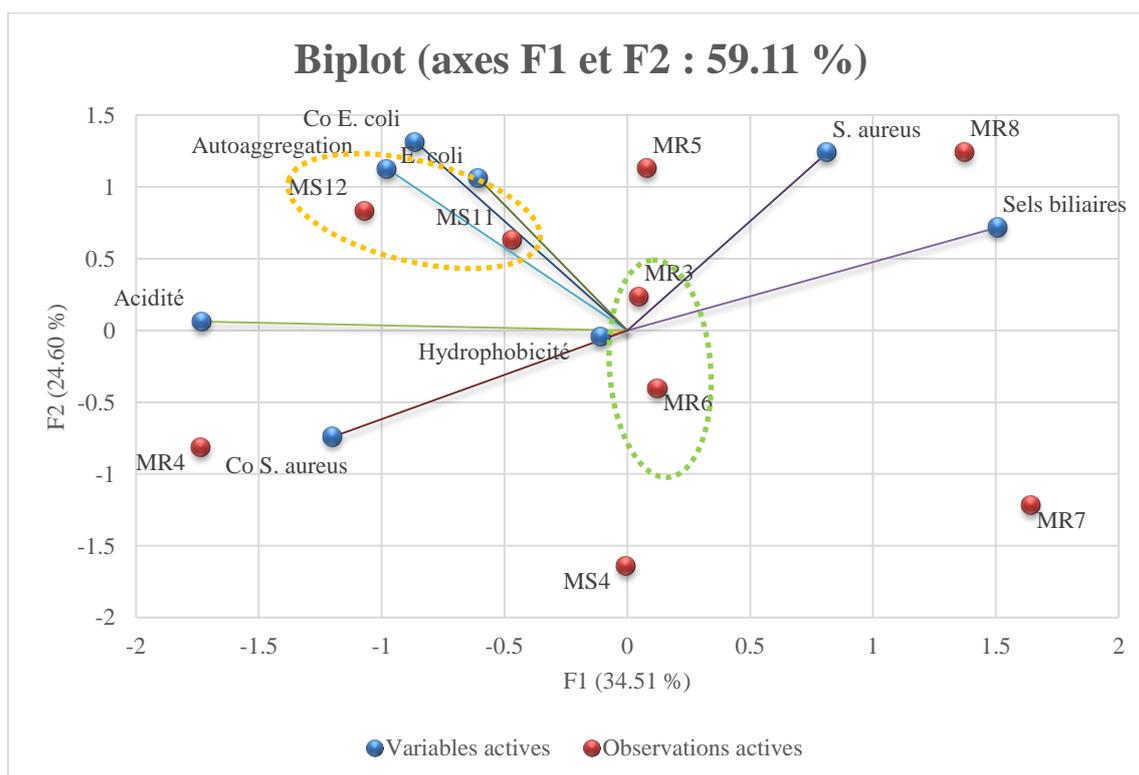


Figure 193. Analyse en composantes principales des propriétés probiotiques des souches lactiques isolées du lait de chamelle.

La Fig. 23 montre la projection des variables et des souches probiotiques sur le plan formé par les 2 premiers facteurs (F1 et F2).

A l'exception de l'hydrophobicité, les autres variables sont bien représentées sur ce plan.

Dans cette étude, on constate que l'hydrophobicité et l'auto-agrégation ne sont pas corrélées. Ce qui indique que la capacité d'adhésion des souches probiotiques à l'intestin se fait à divers degrés. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Devi et *al.* (2015). En revanche, Nicolich et *al.* (2010) ont trouvé que toutes les souches des genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* testées qui ont montré une capacité d'auto-agrégation possèdent une forte adhérence à l'hexadécane. Del Re et *al.* (2000) ont constaté également que les cellules de bifidobactéries qui ne s'autoagrègent pas ne s'adhèrent pas au Caco-2 cells.

L'auto-agrégation et la co-agrégation (avec les 2 souches pathogènes) sont corrélées positivement. Il est possible que les mêmes facteurs superficiels d'attachement des souches probiotiques soient incriminés dans l'auto-agrégation ainsi que dans la co-agrégation.

On remarque aussi que la tolérance à l'acidité est corrélée négativement avec celle aux sels biliaires. Ceci concorde avec le résultat de Bautista-Gallego et *al.* (2013).

Une forte corrélation positive existe entre l'activité antibactérienne contre *E. coli* et la co-agrégation des souches probiotiques avec cette bactérie pathogène. Par ailleurs, l'antagonisme et la co-agrégation des souches lactiques contre *S. aureus* sont négativement corrélés. La combinaison des résultats de ces 2 tests peut expliquer la forte inhibition d' *E. coli* par les neuf souches lactiques avec des diamètres variant entre (24-34,66 mm), en comparant avec celle obtenue contre *S. aureus* (12,66-24 mm).

Bao et *al.* (2010) ont mentionné que les bactéries probiotiques capables de se co-agréger avec celles pathogènes peuvent les inhiber et les tuer efficacement après déplacement direct des composés antimicrobiens produits. Ceci peut expliquer les résultats obtenus contre *E. coli*. Tandis que, l'inhibition de *S. aureus* se fait principalement par les métabolites relargués dans le milieu comme les bactériocines qui sont actives surtout contre les bactéries à Gram positif (Savadogo et *al.*, 2009).

On peut classer les souches étudiées en 3 groupes distincts :

- Les souches MS12 et MS11 forment un groupe des souches qui possèdent des fortes valeurs à la plupart des variables étudiées (l'auto-agrégation, co-agrégation avec *E. coli*

et antagonisme contre cette bactérie, résistance à l'acidité et la co-agrégation avec *S. aureus*).

- Les souches MR3 et MR6 forment un groupe des souches ayant des valeurs moyennes à toutes les variables étudiées.
- Les 5 souches restantes sont séparées les unes des autres et montrant une hétérogénéité par rapport aux variables étudiées. Ces souches, pourraient avoir, en principe, une application limitée en tant que probiotiques potentiels.

III.3.5. Caractérisation des souches probiotiques

Toutes les neuf souches probiotiques sont identifiées au stade genre après application des tests phénotypiques puis au stade espèce par séquençage de leur ARNr 16S.

III.3.5.1. Identification phénotypique au stade genre

Après cultivation sur le milieu MRS et observation macroscopique, les colonies des souches bactériennes sélectionnées sont de petites taille, blanches et lisses (Fig. 24a).

L'examen microscopique des bactéries a été effectué après coloration de Gram. La forme des cellules de toutes les souches à Gram positif est coccoïde. Elles sont arrangées en paires ou en chainettes courtes et/ou longues (Fig. 24b).

Le CO₂ a été produit par toutes les bactéries cultivées sur le milieu MRS sans citrate, ce qui indique que la fermentation de glucose est de type hétérofermentaire.

Comme montré dans la (Fig. 24c), un virage de couleur du milieu vers le jaune autour des spots bactériens a été observé à cause de la production des acides. Donc, toutes les souches sont dépourvues de l'enzyme arginine déshydrogénase ou ADH (-).

Sur le milieu bile esculine agar, toutes les souches probiotiques sont développées sans noircir le milieu. Ceci indique qu'elles ne possèdent pas d'esculinase.

Selon les résultats des tests physiologiques montrés dans le Tab.17, toutes les souches sont capables de se développer à une température de 10 °C mais non à 45 °C. Aucune souche n'a pu tolérer 6,5% ni 18% de NaCl. Certaines sont capables de se développer à un pH de 4,4 mais aucune n'a pu tolérer le pH 9,6. Toutes les souches bactériennes ne peuvent pas résister à une température 60 °C pendant 30 min.

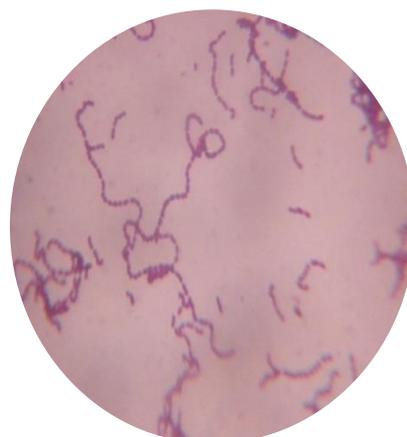
D'après les résultats obtenus et selon Axelsson (2004), 3 genres lactiques hétérofermentaires dont la forme de leurs cellules est coccoïde sont *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.

Ces souches n'appartiennent pas au genre *Oenococcus* qui se trouve presque exclusivement dans le jus des raisins, le vin et vin fortifié (Dicks et Holzappel, 2009).

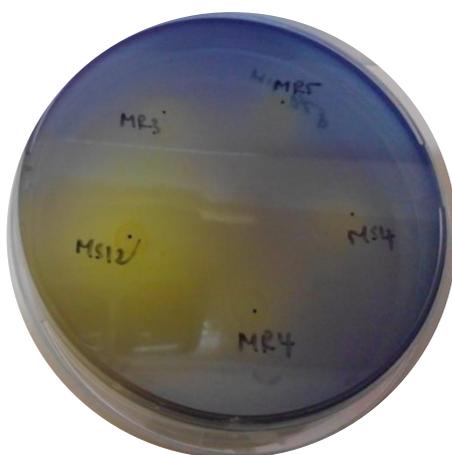
Bien que la distinction entre les genres *Weissella* et *Leuconostoc* par des caractéristiques phénotypiques soit difficile, les membres du genre *Weissella* ne sont pas répons dans le lait et les produits laitiers (Björkroth et al., 2009). Ces souches probiotiques sont rattachées alors au genre *Leuconostoc*.



a- Aspect des colonies d'une souche de *Leuconostoc* sur MRS



b- Vue microscopiques des cellules de *Leuconostoc* (x1000)



c- Résultats du test ADH des souches de *Leuconostoc*

Figure 204. Résultats de quelques tests utilisés pour l'identification phénotypique des isolats probiotiques.

Tableau 17. Identification phénotypique des isolats probiotiques.

Souches	Forme	Caractères cultureux	Gas à partir de glucose	Croissance à (°C)			Croissance à pH			ADH	Hydrolyse de l'esculine
				10 °C	45 °C	18%	6,5%	4,4	9,6		
MR6	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MS12	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MR3	Cocci (paires)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MR4	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MR5	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MS4	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	±	-	-	-	-
MR7	Cocci (chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MR8	Cocci (paires et chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MS11	Cocci (paires et chaines)	Petites colonies, blanches, lisses	+	-	-	-	-	-	-	-	-

III.3.5.2. Identification génotypique des souches probiotiques

L'une des méthodes d'identification bactérienne la plus appropriée et la plus utilisée est le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Ces gènes conservés présentent une variabilité suffisante pour être considérés comme excellents marqueurs phylogénétiques pour l'identification au niveau du genre et de l'espèce (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019).

Après amplification du gène ARNr 16S de chaque souche probiotique et migration de leurs produits, une seule bande avec un poids moléculaire d'environ 1500 paires de base a été détectée (Fig.25).

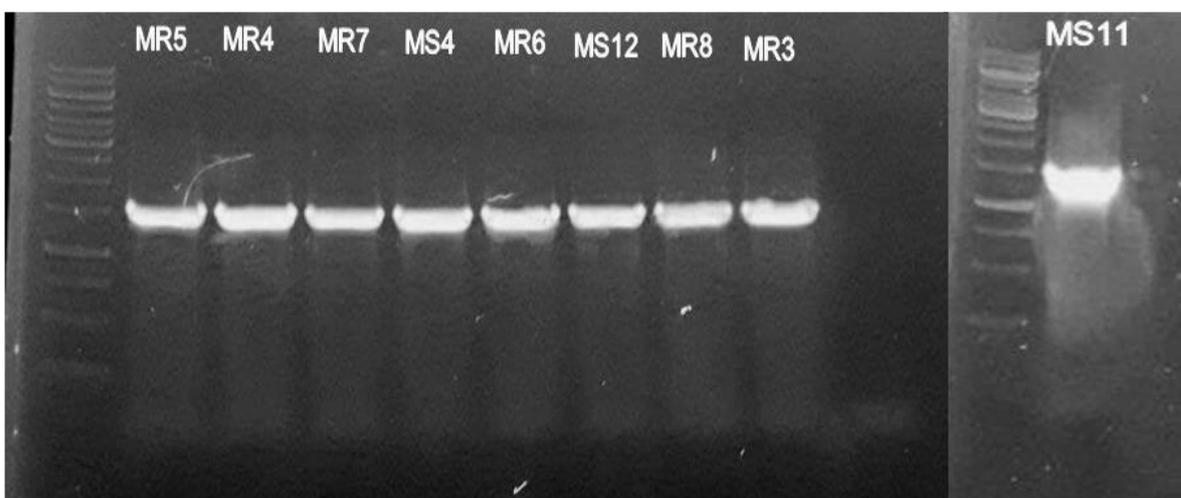


Figure 215. Bandes d'ADN obtenues après séparation des produits d'amplification de l'ARNr 16S de chaque souche probiotique.

L'analyse partielle du gène ARNr 16S a permis de confirmer que les neuf souches probiotiques appartiennent au genre *Leuconostoc*. L'alignement des séquences obtenues avec celles des espèces disponibles dans les banques de données (Genbank) en utilisant le "NCBI Blast" a permis de les identifier comme *Leuconostoc mesenteroides* avec une similarité significative de (94 %-99 %) (Tab.18).

Tableau 18. Proximités phylogénétiques des bactéries sur la base de la similarité avec la séquence partielle de l'ARNr 16S.

Souches	Description	Numéro d'accèsion	Homologie (%)	Score (Query cover)	La valeur-E
MR6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain TW33-1	MK680142	97 %	99 %	0.0
MS12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain LK-151	MK680143	98 %	100 %	0.0
MR3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. jonggajibkimchii strain YS7-5	MK680144	94 %	92 %	0.0
MR4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 1-15	MK680146	99 %	100 %	0.0
MR5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 1-15	MK680147	97 %	98 %	0.0
MS4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 1-15	MK680148	96 %	100 %	0.0
MR7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 1-15	MK680149	98 %	100 %	0.0
MR8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL13	MK680145	98,88 %	100 %	0.0
MS11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain lmn4	MK680150	95 %	99 %	0.0

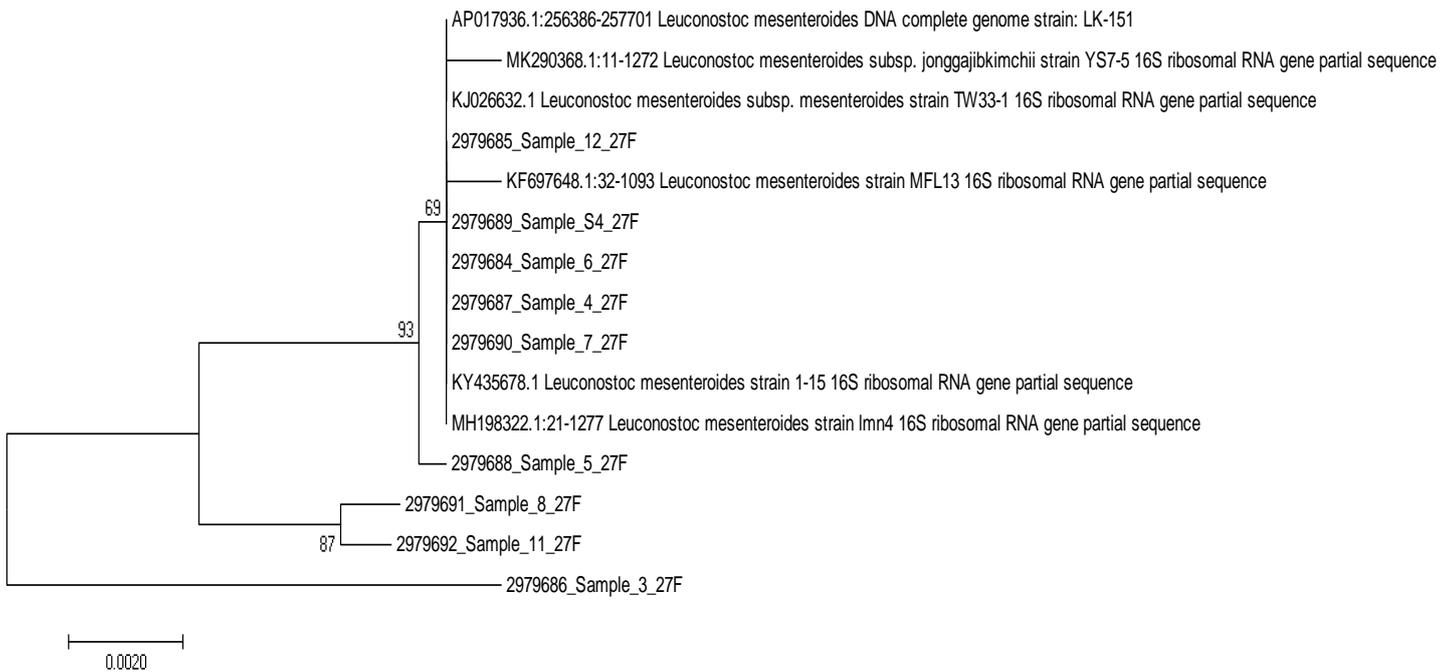


Figure 26. Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les souches probiotiques construit par la méthode de neighbor- joining.

Sample 12 : MS12, Sample S4 : MS4, Sample 6 : MR6, Sample 4 : MR4, Sample 7 : MR7, Sample 5 : MR5, Sample 8 : MR8, Sample 11 : MS11, Sample 3 : MR3.

En examinant l'arbre phylogénétique (Fig. 26), il s'avère que les différentes souches sont génétiquement et étroitement liées appartenant à une seule espèce (*Leuconostoc mesenteroides*). Les leuconostocs sont plus fréquemment associés au lait et aux produits laitiers. Leur présence est due à une contamination pendant la traite ou la fabrication. Elle est renforcée par leur particularité de survivre longtemps sur certaines surfaces telles que le bois et les moisissures ou dans le pasteurisateur.

Ils peuvent provoquer des effets indésirables dans le lait frais. Toutefois, les souches de *Leuconostoc* sélectionnées ont une valeur particulière et sont utilisées comme culture starter pour une variété de produits laitiers fermentés (Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Morandi et al., 2013).

L'occurrence du genre *Leuconostoc* dans le lait de chamelle et dans leurs produits fermentés a été rapportée par plusieurs auteurs.

A partir du lait de chamelle cru d'Algérie ; Bellil et al. (2014) ont caractérisé phénotypiquement 60 colonies différentes identifiées comme *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Benmechernene et al. (2014) ont également isolé 13 souches de *Leuconostoc*, dont 2 souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* sont probiotiques. Par ailleurs, Merzouk et al. (2013) n'ont isolé aucune souche.

Une dominance de ce genre a été signalée par Alaoui Ismaili et al. (2016b) qui ont dénombré $4,45 \times 10^7$ UFC/mL dans le lait cru marocain.

A partir des produits fermentés du lait de chamelle ; Kacem et Karam (2006b) ont isolé parmi 181 LAB, 9 souches de *Ln. pseudomesenteroides* et 12 souches de *Ln. gelidum* à partir du beurre (shmen) produit à partir du lait de chamelle algérien. Rahman et al. (2009) ont trouvé que *Leuconostoc* ne constituent qu'un pourcentage de 10 des LAB isolées du Shubat. Lore et al. (2005) ont rapporté un pourcentage de 24 constitué par *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* à partir du Suusac.

Chapitre IV : Propriétés technologiques et nutritionnelles des souches probiotiques

IV.1. Introduction

Outre les propriétés probiotiques, les LAB doivent présenter des propriétés nutritionnelles et avoir des applications technologiques intéressantes telles que ; la production des polysaccharides et des substances aromatiques, la fermentation du lactose et du citrate, etc.

Les souches du genre *Leuconostoc* se développent lentement dans le lait et elles ne sont pas, généralement, aussi actives dans la production d'acide lactique. Elles sont utilisées couramment comme seconde starter culture grâce à divers composés produits tels que l'acétaldéhyde, le diacétyle et l'acétoïne à partir du lactate et du citrate, qui contribuent aux propriétés organoleptiques des produits laitiers. De plus, elles possèdent également d'autres propriétés technologiques importantes, telles que la synthèse des dextrans à partir du saccharose et la présence d'activités protéolytique, lipolytique et aminopeptidasique (Morandi et al., 2013)

Ce chapitre vise à évaluer certaines caractéristiques nutritionnelles et technologiques chez les souches probiotiques de l'espèce *Ln. mesenteroides*.

IV.2. Matériel et Méthodes

IV.2.1. Propriétés nutritionnelles

IV.2.1.1. Utilisation du lactose

1 % (v/v) des cultures jeunes de chaque souche probiotique sont inoculées dans des tubes contenant un bouillon au lactose (Annexe 1). Après incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h, un virage de couleur du milieu du rouge vers le jaune indique que les souches utilisent le lactose (Pundir et al., 2013).

IV.2.1.2. Production de l'amylase

L'activité amylolytique a été faite selon le protocole décrit par Fossi et Tavea (2013). Sur un milieu contenant l'amidon soluble (Annexe 1), on a déposé des stries de 2 cm à partir de chaque culture bactérienne jeune. Après incubation à 30 °C pendant 48 h, la révélation de l'amylase a été assurée par le lugol.

IV.2.1.3. Profil fermentaire

Dans des tubes contenant 10 mL du milieu basal de fermentation (bouillon MRS sans glucose) supplémenté par un substrat glucidique à 1% (p/v) (glucose, saccharose, lactose, fructose, FOS),

100 µL de chaque culture bactérienne jeune sont inoculés (10^4 à 10^5 UFC/mL). Après incubation pendant 24 h à 30 °C, la croissance des souches a été examinée en mesurant les densités optiques par spectrophotomètre réglé à 600 nm et équipé d'une cuvette de 1 cm. L'expérience a été répétée 3 fois et les valeurs moyennes de DO ont été calculées. Le niveau de fermentation de chaque sucre a été comparé avec le glucose qui sert comme référence (100 %) (Kneifel et al., 2000).

IV.2.2. Propriétés technologiques

IV.2.2.1. Production des dextrans

La production des dextrans par les neuf souches probiotiques a été mise en évidence sur le milieu MSE agar (Annexe 1). Les cultures bactériennes de 16-18 h sontensemencées par stries à la surface des boîtes et incubées à 30 °C pendant 24 h à 48 h. L'apparition des colonies présentant une croissance gluante très visqueuse indique la production des dextrans (Zarour et al., 2013).

IV.2.2.2. Production de citratase

Elle a été testée sur le milieu Kempler et McKay ou KMK (Annexe 1). Ce dernier contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium.

La réaction entre ces ions peut avoir lieu dans les colonies bactériennes qui fermentent le citrate grâce à la citratase, une enzyme qui existe chez certaines espèces de *Leuconostoc*. Il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation à l'obscurité). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Kempler et McKay, 1980).

IV.2.2.3. Pouvoir aromatisant

La production de l'acétoïne a été vérifiée par le test de Voges Proskauer. Les souches probiotiques sont inoculées dans des tubes contenant 5 mL de bouillon Clarck et Lubs. Après incubation à 30 °C pendant 24 h et développement des bactéries, 1 mL de chaque culture est transféré dans un tube à hémolyse.

Ensuite, 0,5 mL de chaque réactif VP1 et VP2 sont ajoutés aux tubes contenant les cultures bactériennes. Ces derniers sont agités vigoureusement et laissés à température ambiante

pendant 30 min. Le virage du milieu vers le rose cerise ou l'apparition d'un anneau rouge indique que la souche bactérienne produit l'acétoïne (Moulay et *al.*, 2013).

IV.2.2.4. Activité protéolytique

Sur un milieu PCA additionné de 10 % du lait écrémé (0 % MG), un volume de 2 µL de chaque culture probiotique jeune a été déposé. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 h. La souche est dite protéolytique lorsque le spot est entouré d'une zone claire (Moulay et *al.*, 2013).

IV.2.2.5. Activité lipolytique

Sur un milieu MRS additionné de 1 % d'huile d'olive (source lipidique naturelle), un volume de 2 µL de chaque culture lactique jeune a été déposé. Après incubation des boîtes à 30 °C pendant (24 h à 5 jours), la formation des zones claires autour des spots bactériens indique la présence d'une activité lipolytique (Karam et *al.*, 2012).

IV.2.2.6. Cinétique d'acidification

Des flacons contenant 100 mL de lait écrémé stérile (Candia silhouette) sont inoculés par 1 mL des souches lactiques dans la phase exponentielle. Le pH a été suivi à 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h (Fguiri et *al.*, 2017).

Analyse statistique

L'analyse statistique des données obtenues a été effectuée à l'aide du logiciel R (version 3.5.1). Les comparaisons des différences entre les moyennes des traitements répétés 3 fois ont été faites par une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) suivie du test de Tukey à un niveau de signification de $P < 0,05$.

IV.3. Résultats et discussion

IV.3.1. Propriétés nutritionnelles

IV.3.1.1. Utilisation du lactose

La capacité d'utilisation du lactose par les neuf souches probiotiques a été testée sur un milieu de fermentation supplémenté du lactose. Un changement de couleur du rouge vers le jaune a été observé chez toutes les souches bactériennes. Ceci indique leur capacité de métaboliser le lactose en galactose et en glucose par une β -galactosidase pour produire à la fin de l'acide lactique.

Ahmed et Kanwal (2004) ont isolé, également, du lait de chamelle des LAB capables d'utiliser le lactose. Shukla et *al.* (2014) ont mesuré la quantité de β -galactosidase produite par des LAB. Ils ont constaté que la meilleure production de cette enzyme a été enregistrée chez *Ln. mesenteroides* NRRL B-1149 avec une activité de $94,24 \pm 3,9$ (MU) en comparant avec celles des autres bactéries probiotiques telles que *Lb. plantarum* Lp1017 (82,72 MU) et *Lb. plantarum* Lp814 (82,69 MU).

Parmi les effets bénéfiques associés à la consommation des probiotiques, l'atténuation de l'intolérance au lactose chez certaines personnes (Gagnon, 2007). Ces dernières ne peuvent pas le métaboliser en raison d'une déficience en une enzyme essentielle qui est la β -galactosidase. En effet, lorsqu'elles consomment du lait ou des produits contenant du lactose, des symptômes tels que des douleurs abdominales, crampes et diarrhées apparaissent. Si le lactose passe par l'intestin grêle, il est transformé en gaz et en acide dans le gros intestin par la microflore du côlon. La présence d'hydrogène dans l'haleine est également un signe de mal digestion du lactose (Pundir et *al.*, 2013).

Une amélioration de la digestion du lactose et une élimination de ces symptômes d'intolérance, suite à la consommation des produits laitiers fermentés, sont associées à la présence d'une β -galactosidase microbienne (De Vrese et *al.*, 2001). Elle peut être due également lors de la croissance d'un probiotique dans le tractus gastro-intestinal qui libère la lactase (Chung, 2002).

IV.3.1.2. Activité amylolytique

Certaines LAB produisent l'amylase qui est une enzyme jouant un rôle important dans le TGI des volailles et des mammifères citant par exemple, le porc, le cheval, le lapin et les êtres humains, y compris les nourrissons. De plus, les amylases présentent un intérêt accru en raison de leurs applications commerciales, médicales et chimiques potentielles, telles que la

fabrication de liqueur d'amidon, la brasserie, du papier, des détergents, la formulation de lotions, de pommades et la production de biopolymères comme les sutures chirurgicales (Padmavathi et *al.*, 2018).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées sont dénuées de l'amylase. Il n'existe pas des données dans la littérature sur l'activité amylolytique des LAB du lait de chamelle. Par ailleurs, Khedid et *al.* (2009) ont caractérisé la flore lactique du lait de chamelle et ont isolé *Lactobacillus amylophilus*, une souche bénéfique dans la fermentation de l'amidon brut en acide lactique et qui a de nombreuses applications dans les industries alimentaires.

IV.3.1.3. Profil fermentaire

On a choisi de tester quatre sucres couramment retrouvés dans l'alimentation glucose, saccharose, lactose et fructose. En plus des FOS, le prébiotique le plus communément commercialisé. Les FOS sont constitués d'oligosaccharides d'origine végétale. Ils se trouvent en concentrations variables dans de nombreux aliments tels que les oignons, les asperges, les artichauts, l'ail, le blé, les bananes, les tomates et le miel (Sabater-Molina et *al.*, 2009 ; Sanz et Santacruz, 2010).

Selon les résultats obtenus (Fig. 27), ces glucides ont été utilisés différemment par les souches. En comparaison avec le glucose utilisé comme référence (100 %), le saccharose est fermenté avec des pourcentages supérieurs à 50 pouvant atteindre 104.74 chez la souche MR5. Pour les 3 autres glucides, de faibles pourcentages ont été recordés avec une meilleure fermentation du fructose dont les pourcentages varient de 13.52 par MS4 et 21.66 par MR8. Le lactose est fermenté faiblement par les souches de *Leuconostoc* avec un meilleur pourcentage de 13.34 par MS12. Pour les FOS et à l'exception de (MR3, MR4, MS12), la croissance des souches restantes est très faible.

Giraffa (2014) a mentionné que certaines LAB préfèrent les disaccharides plutôt que les monosaccharides comme substrats de croissance, même si la fermentation des disaccharides semble plus compliquée que celle des monosaccharides. Ceci peut expliquer les hauts pourcentages obtenus de la fermentation du saccharose par la plupart des souches testées.

Chez *Ln. mesenteroides* le saccharose est clivé par une enzyme associée à la paroi, dextranucrase, le glucose résultant est utilisé pour la synthèse des dextrans. Tandis que le fructose est fermenté selon la manière usuelle (von Wright et Axelsson, 2019).

Lorsque le fructose est présent comme source unique de carbone, il est généralement utilisé par *Leuconstoc* spp. à la fois comme source de carbone et comme accepteur d'électrons (Bjorkroth et al., 2014).

Des ingrédients prébiotiques sont de plus en plus souvent ajoutés aux préparations alimentaires contenant des probiotiques afin d'améliorer la survie et la croissance des probiotiques (Farinha et al., 2015). Selon les résultats obtenus, le prébiotique FOS comme seule source de carbone n'influence pas la croissance de la plupart des souches de *Leuconstoc mesenteroides*.

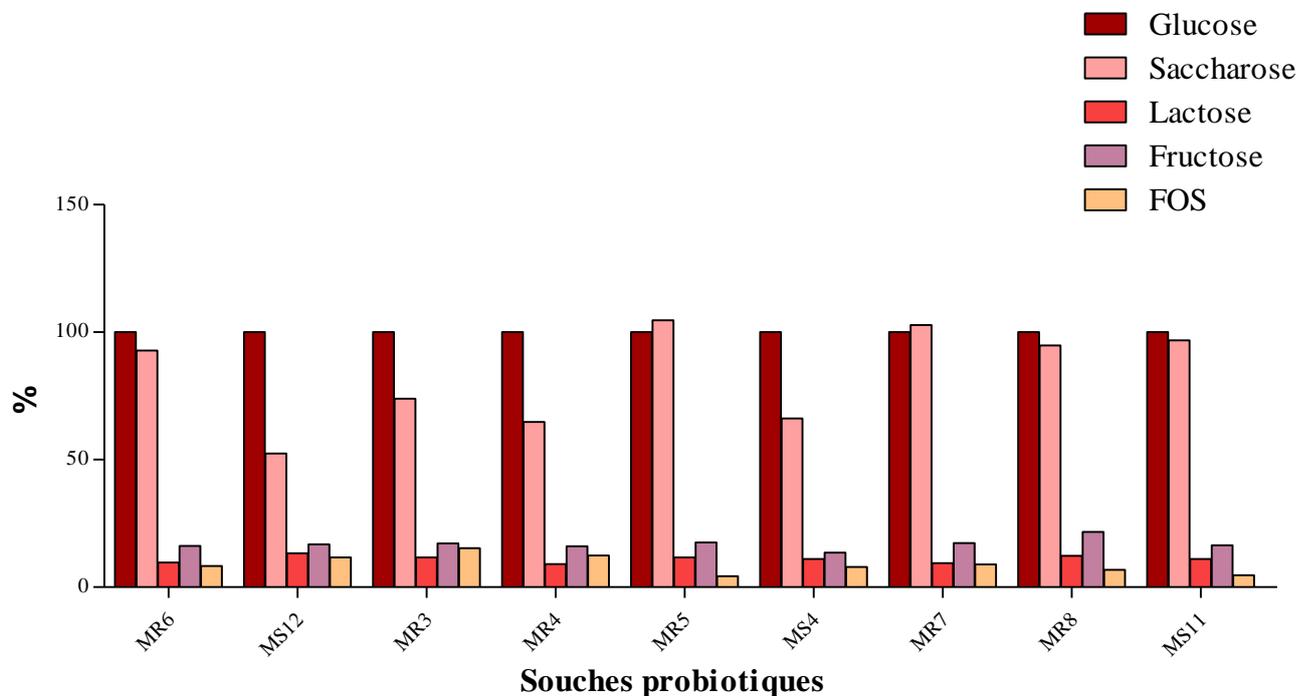


Figure 227. Fermentation de certains substrats glucidiques par les souches probiotiques.

IV.3.2. Propriétés technologiques

IV.3.2.1. Production des dextrans

A l'exception de MS4, toutes les souches sont capables de produire les dextrans dans le milieu hypersaccharosé MSE (Fig. 28).



Figure 238. Aspect des colonies d'une souche *Ln. mesenteroides* sur la gélose MSE.

L'espèce *Ln. mesenteroides* est présente dans plusieurs aliments naturellement fermentés et connue pour produire les dextrans qui sont des polymères de glucose biodégradables. Les dextrans ont une large gamme d'applications commerciales dans les industries alimentaires, pharmaceutique et chimique en tant qu'adjuvant, émulsifiant, support et stabilisateur (Patel et al., 2012, Shukla et al., 2014). Ils ont aussi des activités biologiques telles que les effets immunomodulateurs et antitumoraux. Ainsi dans une étude, il a été démontré que les dextrans produits par *Ln. mesenteroides* B-1149 inhibent la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa) et des cellules cancéreuses du côlon (HT-29) (Shukla et al., 2014; Han et al., 2015).

Au contraire, dans le cidre, la bière ou le vin, la synthèse d'EPS provoque une altération grave appelée « maladie de la graisse » ou « maladie des vins filants » (Walling et al., 2001).

IV.3.2.2. Production de citratase

Le citrate est présent dans les jus de fruits, le lait et les légumes. Il est également ajouté comme conservateur dans les aliments. Sa fermentation par les LAB conduit à la production des composés à 4 carbones, principalement le diacétyl, l'acétoïne et le butanediol, qui ont des propriétés aromatiques. Ainsi, la saveur et l'arôme de nombreux produits laitiers fermentés sont due grâce au diacétyl formé par certaines espèces lactiques comme *Leuconostoc* spp. (Kempfer et McKay, 1980 ; García-Quintans et al., 2008).

De plus, le CO₂ produit par le métabolisme des citrates contribue à la formation des yeux (trous) dans le Gouda, le Danbo et d'autres fromages (García-Quintans et *al.*, 2008).

Après culture sur le milieu KMK, les colonies de toutes les souches testées apparaissent bleues (Fig. 29). Ce qui indique leur utilisation du citrate exerçant ainsi un effet très positif sur la qualité des produits finaux.

Mokdad et *al.* (2020), Moulay et *al.* (2013), Zarour et *al.* (2013) et Bellil et *al.* (2014) ont également isolés des souches *Ln. mesenteroides* du lait de chamelle algérien qui produisent la citratase.



Figure 29. Utilisation du citrate (colonies bleues) par quelques souches probiotiques sur le milieu KMK.

IV.3.2.3. Pouvoir aromatisant

La production de l'acétoïne responsable de l'arôme des produits fermentés et de leur conservation a été vérifié sur le milieu Clarck et Lubs. Les résultats obtenus indiquent qu'aucune souche n'a pu produire l'acétoïne à partir de glucose, ce qui correspond aux caractères de certaines sous espèces de *Ln. mesenteroides* (Zarour et *al.*, 2013).

IV.3.2.4. Activité protéolytique

D'après la Fig. 30 et le Tab. 19, il s'avère que toutes les souches lactiques testées possèdent une bonne activité protéolytique sur le milieu PCA additionné de 10 % de lait.

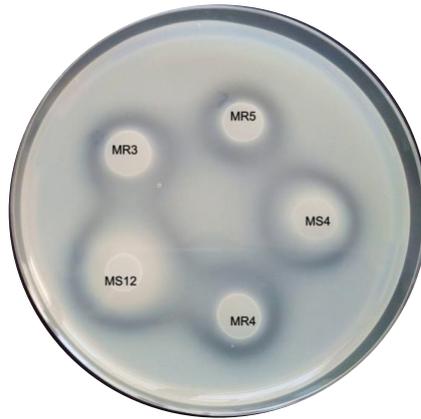


Figure 30. Activité protéolytique de quelques souches de *Ln. mesenteroides*.

Tableau 19. Diamètres (mm) de protéolyse obtenus par les souches probiotiques sur le milieu PCA au lait (10 %).

Souches probiotiques	Diamètres (mm) \pm sd
MR6	18,66 \pm 1,52 ^a
MS12	29 \pm 1,00 ^c
MR3	20 \pm 0,00 ^a
MR4	19,5 \pm 0,50 ^a
MR5	20,50 \pm 0,50 ^{ab}
MS4	22,5 \pm 0,50 ^b
MR7	19 \pm 1.00 ^a
MR8	20,5 \pm 0,50 ^{ab}
MS11	18,5 \pm 0,50 ^a

Les valeurs représentent la moyenne des diamètres de protéolyse de 3 répétitions \pm sd (mm), Les moyennes avec des lettres différentes dans le même rang sont significativement différentes ($p < 0,05$) (Anova).

Le pouvoir protéolytique varie très significativement entre les souches et les diamètres des zones claires varient entre (18,5± 0,5 mm et 29±1,00 mm) obtenus par les souches MR6 et MS12 respectivement.

Bien que les LAB ne soient pas considérées comme des bactéries fortement protéolytiques, leur système protéolytique est essentiel pour une croissance optimale dans le lait. Il participe de manière significative au développement de certaines caractéristiques organoleptiques dans différents produits laitiers fermentés (Morandi et *al.*, 2013).

En outre, la protéolyse pourrait également contribuer à prévenir les allergies fréquentes chez les enfants de moins de 3 ans en raison d'une mauvaise digestion des protéines du lait (de Almeida Júnior et *al.*, 2015).

IV.3.2.5. Activité lipolytique

Aucune souche de *Ln. mesenteroides* n'a été lipolytique. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par plusieurs auteurs (Nieto-Arribas et *al.*, 2010 ; Morandi et *al.*, 2013). Toutefois, une faible activité lipolytique a été détectée chez les souches *Leuconostoc* isolées par Karam et *al.* (2012) et Mokdad et *al.* (2020).

Le choix du milieu, sur lequel les souches probiotiques ont été testées pour leur activité lipolytique, est basé sur les résultats obtenus par Karam et *al.* (2012) qui ont trouvé une bonne activité lipolytique chez la majorité des souches lactiques testées sur ce milieu.

Les LAB sont faiblement lipolytiques par rapport aux autres bactéries comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Fguiri et *al.*, 2017). Peu d'informations sont connues sur leur contribution à la lipolyse du fromage et au développement des arômes (Karimi et *al.*, 2012). Cette faible activité est considérée comme un avantage important, car une légère rupture de la matière grasse du lait suffit pour induire un arôme sans donner au fromage un goût rance (Morandi et *al.*, 2013).

IV.3.2.6. Cinétique d'acidification

La capacité de production d'acide par les souches lactiques est une propriété importante pour sélectionner une culture starter pour la fermentation lactique du lait.

En effet, l'activité acidifiante de chaque souche est liée à sa capacité spécifique de décomposer des substances dans le milieu afin de les rendre faciles à l'assimilation. Ainsi, la fermentation du lactose en acide lactique abaisse le pH et favorise la protéolyse (Fguiri et *al.*, 2017).

L'évolution du pH pour les cultures probiotiques a été suivie à 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h et 72 h et les résultats obtenus sont résumés dans la Fig. 31.

Il a été signalé que le pH après 6 h d'incubation est important car il permet la distinction entre les différentes souches et fournit quelques indications sur la cinétique d'acidification (Demirci et Hemme, 1995).

Les souches MS4 et MS12 sont considérées comme faiblement acidifiantes du lait car elles ont été incapables de réduire le pH de plus d'une unité après 6 heures. Après 24 h d'incubation, la réduction du pH n'était pas importante (0,54 par MS12 et 0,41 par MS4).

De plus, même après 72 h d'incubation, leur pH n'a pas atteint le point final d'acidification (pH 4,6) (Sodini et al., 2002). Toutefois, les souches restantes ne sont plus acidifiantes.

La faible activité acidifiante du *Leuconostoc* peut être expliquée par le métabolisme hétérofermentaire de ce genre qui produit de l'acide lactique, du CO₂ ainsi que de l'éthanol ou de l'acétate (Morandi et al., 2013). Pour cette raison, il a été suggéré que les isolats de *Leuconostoc* devraient être combinés avec des *Lactococcus* spp. producteurs d'acide dans les cultures mixtes pour la production des fromages vu les arômes et la texture qu'ils développent (Demirci et Hemme, 1995).

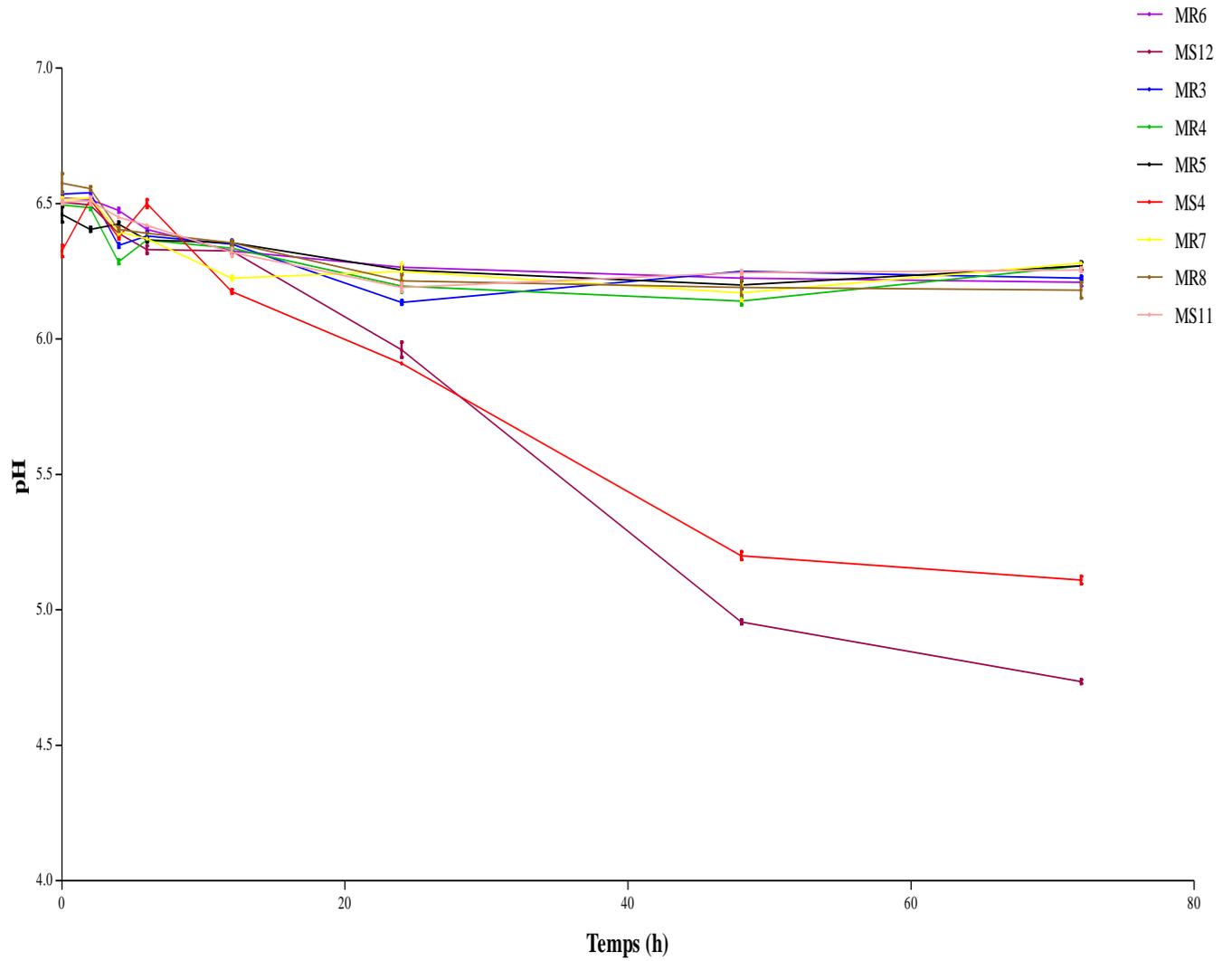


Figure 31. Evolution des cinétiques d'acidification des neuf souches probiotiques en fonction du temps sur le lait écrémé (0 % MG).

Conclusion

A partir de 3 régions de sud-est Algérien, M'sila, Biskra et Oued Souf, 13 échantillons du lait de chamelle ont été prélevés sous des conditions hygiéniques rigoureuses dans le but d'évaluer sa qualité microbiologique sans aucun traitement. Après réalisation des tests qualitatifs (réduction au bleu de méthylène et mesure du pH) et quantitatifs (dénombrement de certains microorganismes), les résultats obtenus révèlent que la charge microbienne dans tous les échantillons du lait de chamelle est faible.

La qualité microbiologique du lait examiné est meilleure que celle décrite dans plusieurs études. Cela peut être associé aux bonnes pratiques sanitaires.

Cependant, des *Staphylococcus* spp. ont été enregistrés avec une fréquence relativement élevée dans certains échantillons. Il est donc important de traiter le lait de chamelle par la chaleur ou la fermentation avant de le consommer pour éviter tout risque sanitaire surtout par les personnes immunodéprimées.

Dans le but d'isoler de nouvelles souches probiotiques, les échantillons du lait de chamelle ont été soumis à une fermentation spontanée pour enrichir sa microflore lactique.

73 isolats lactiques actifs contre 8 bactéries pathogènes et de détérioration des aliments ont été retenus parmi 78 LAB isolées. A partir de ces isolats, neuf souches seulement ont été sélectionnées montrant des capacités adhésives considérables. En effet, elles ont des niveaux d'hydrophobicité modéré à élevé. Elles peuvent toutes s'auto-agrégger avec des pourcentages $\geq 89,60$ %. Le pouvoir de co-agrégation avec 2 souches pathogènes diffère d'une souche à une autre. Ainsi, les souches MS12 et MR4 ont montré de hauts niveaux avec des pourcentages de 133 % et 104 % contre *E. coli* et *S. aureus* respectivement.

Elles résistent toutes à l'acidité du milieu stomacal et possèdent une bonne tolérance à 0,3 % et 0,5 % de sels biliaires. Néanmoins, aucune souche n'a pu se développer à 0,4 % de phénols après une exposition pendant 24 h. Ces souches sont présumées probiotiques, elles peuvent jouer un rôle important dans le TGI et dans l'inhibition des microorganismes pathogènes.

Pour montrer les relations entre différentes variables (activités antibactériennes contre *E. coli* et *S. aureus*, hydrophobicité, auto-agrégation, co-agrégation avec *E. coli* et *S. aureus*, tolérance à l'acidité (pH 3), tolérance à 0,3 % de sels biliaires) et déterminer les souches les plus performantes, une ACP a été réalisée. 2 souches ayant un fort potentiel probiotique (MS12 et MS11) ont été distinguées des autres.

L'identification phénotypique de toutes les souches présumées probiotiques a révélé leur appartenance au genre *Leuconostoc*.

Le séquençage de l'ARNr 16S a déterminé qu'elles sont toutes identifiées comme étant *Ln. mesenteroides*.

L'innocuité des souches sélectionnées a été vérifiée après réalisation de certains tests. Les résultats montrent que toutes les souches sont dénuées d'une activité β . hémolytique. Elles ne possèdent pas des enzymes : gélatinase, DNase et coagulase. Sur 14 antibiotiques testés, toutes les souches ont résisté à 5 seulement: l'acide nalidixique, la colistine, le céfixime, l'oxacilline et l'acide fusidique.

Bien que ces souches probiotiques appartiennent toutes au genre *Leuconostoc* qui n'est pas souvent actif dans la production de l'acide lactique, certaines ont montré des propriétés technologiques et nutritionnelles importantes.

Toutes les souches ont pu utiliser le lactose et fermenter certains substrats glucidiques. Elles sont toutes proteolytiques, productrices des dextranes (sauf MS4) et de diacétyl, participant ainsi au développement de la texture et de la saveur des produits laitiers fermentés. Par ailleurs, elles ne produisent pas l'acétoïne et ne peuvent pas dégrader les lipides et l'amidon. Comme elles sont non acidifiantes à l'exception de 2 souches (MS12 et MS4) qui ont un faible pouvoir d'acidification du lait.

Ces résultats en font des candidats potentiels pour des applications probiotiques et technologiques. D'autres perspectives semblent nécessaires à réaliser :

- ✓ Des essais *in vivo* sont nécessaires pour élucider leurs avantages potentiels pour la santé.
- ✓ Exploitation des propriétés technologiques de ces souches dans les processus de fermentation.
- ✓ Extraction et purification de certains métabolites comme les dextranes et tester leur propriétés (immuno-modulation, antitumorales...).

Références bibliographiques

- Abbas, M.M., Mahasneh A.M. (2014). Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camels milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 1645–1655.
- Abdulla, A.A., Abed, T.A., Saeed, A.M. (2014). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *British Microbiology Research Journal*, 4(4), 381–391.
- Abrhaley, A., Leta, S. (2018). Medicinal value of camel milk and meat. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 552–558.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 316–325.
- Ahmed, T., Kanwal, R. (2004). Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Veterinari Journal*, 24(2), 87-91.
- Al haj, O. A., Al Kanhal, H. A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20(12), 811–821.
- Alaoui Ismaili, M., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., Zahar, M. (2016a). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-Disciplinary Sciences*, 1(1), 81–94.
- Alaoui Ismaili, M., Saidi, B., Zahar, M., Hamama, A., Ezzaier, R. (2016b). Composition and microbial quality of raw camel milk produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(1), 17–21.
- Al-Juboori, A. T., Mohammed, M., Rashid, J., Kurian, J., El Refaey, S. (2013). Nutritional and medicinal value of camel (*Camelus dromedarius*) milk. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 170, 221–232.
- Allameh, S. K., Daud, H., Yusoff, F.M. Saad, C.R., Ideris, A. (2012). Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3810–3816.
- Ameen, S.M., Caruso, G. (2017). Lactic Acid and Lactic Acid Bacteria: Current Use and Perspectives in the Food and Beverage Industry. In: Ameen, S.M., Caruso, G. (eds.). *Lactic Acid in the Food Industry*. Springer International Publishing AG, Switzerland, pp. 33-41.
- Amrouche, T. (2005). *Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués*. Thèse de doctorat, University Laval, Canada.

- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Arés, I., Martínez, M. A. (2016). Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their Safety and Health Benefits. In: Watson, R., R., Preedy, V.R., (eds). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Bioactive Foods in Health Promotion, Elsevier Inc., UK. pp. 1-24.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Parveen Rani, R. (2014). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1–7.
- Ashraf, R., Shah, N. P. (2011). Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18(3), 837–853.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.). Lactic Acid Bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D., Zhou, W., Zheng, X. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 17(8), 597–609.
- Badis, A. Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". *Sciences et Technologie*, 23, 30-37.
- Bajaj, B. K., Claes, I. J. J., Lebeer, S. (2015). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 04(04), 321–327
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135–142.
- Bellil, Y., Benmechernene, Z., Chahrour, W., Naoui, N., Kihal, M. (2014). Selection and evaluation of anti-listerial activity of *Leuconostoc mesenteroides* wild strains isolated from Algerian raw dromedary milk. *Journal of Food Processing and Technology*, 5 (12), 1-7.
- Benkerroum, N., Boughdadi, A., Bennani, N., Hidane, K. (2003). Microbiological quality assessment of moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 645–648.
- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk . *BioMed Research International*, 2013(13), 1–14.
- Benmechernene, Z., Fernández-No, I., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Kihal, M., Calo-mata, P., Barros-velázquez, J. (2014). Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from raw camel milk in two southwest Algerian. *BioMed Research International*, 4, 1-9.

- Benyagoub, E., Ayat, M. (2015). Biochemical, physico-chemical and microbiological properties of camel raw milk marketed in Bechar city (south-west Algeria): Hygienic and safe consumers approach. *Microbes and Health*, 4(1), 14–18.
- Benyoucef, A., Hansal, N., Said, L., Lhadj Said, M. A., Bentabet, H., Kihal, M., Benmechernene, Z. (2017). Evaluation of technological properties of *Leuconostoc mesenteroides*(V1) strain isolated from Algerian goat's milk. *Advances in Environmental Biology*, 11(1), 26–38.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174.
- Birri, D. J., Brede, D. A., Tessema, G. T., Nes, I. F. (2013). Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Ethiopian infants. *Microbial Ecology*, 65(2), 504–516.
- Björkroth, J., Holzappel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. (eds.). *The Prokaryotes*, 3rd Edn. Springer Science +Business Media, New York. pp. 267–319.
- Björkroth, J., Holzappel, W. H., Dicks, L. M. T. (2009). Genus III. *Weissella*. In : De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (eds.). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* 2 ed., Vol. 3, Springer, pp. 643-654.
- Bjorkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., Holzappel, W.H. (2014). The genus *Leuconostoc*. In: Holzappel W.H., Wood B.J.B (eds.). *Lactic acid bacteria Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 391-404.
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M.V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Scharpen, A.R., Signorini, M., Frizzo, L. (2015). *In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 101, 50–56.
- Borges, S., Barbosa, J., Teixeira, P. (2016). Gynecological Health and Probiotics. In: Watson, R., R., Preedy, V.R. (eds.). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Bioactive Foods in Health Promotion*. Elsevier Inc., UK. pp. 741-754.
- Bouguerra, A. (2012). *Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle*. Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Boussouar, N. (2017). *Caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest Algérien*. Thèse de Doctorat, université Aboubeker Belkaid, Tlemcen.
- Castex, M. (2009). *Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie*. Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris.

- Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Fadda, S. (2010). Proteomics: A Tool for Understanding Lactic Acid Bacteria Adaptation to Stressful Environments. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (eds.). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Blackwell publishing, USA. pp. 57-72.
- Chen, W., Hang, F. (2019). Lactic Acid Bacteria Starter. In: Chen Jiangnan, W. *Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. and Science Press. pp. 93-144.
- Chentouf, H. F., Benmechernene, Z. (2016). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961–2969.
- Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., Kang, S. S. (2018). Antagonistic Activities and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Derived From a Plant-Based Fermented Food. *Frontiers in microbiology*, 9, 1963.
- Choudhary, J., Dubey, R.C., Sengar, G., Dheeman, S. (2018). Evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus pentosus* MMP4 isolated from mare's lactation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 403–412.
- Chung, C.H. (2002). *A potential nutraceutical from Leuconostoc mesenteroides B-742 (ATCC 13146); production and properties*. Thèse de doctorat, Université de Louisiana State.
- Chun-lei, Z., Jia-qi, L., Hai-tao, G., Jie, W., Ri-hua, X. (2014). Selection of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolates from Inner Mongolian traditional yoghurt. *Mljekarstvo*, 64(4), 254–260.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Salminen, S. (2010). Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (eds.). *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Elsevier Inc., USA. pp. 353-370.
- Collins, F.W. J., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R. P. (2019). Antimicrobials from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Applications. In: Vinderola, G., Ouwehand, A.C., Salminen, S. von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects Fifth Edition*. Taylor & Francis Group, LLC pp. 151-174.
- Critienden, R., Playne, M.J. (2009). Prebiotics. In: Lee, Y.K., Salminen, S. (eds). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America. pp. 533-582.
- Davati, N., Yazdi, F. T., Zibaee, S., Shahidi, F., Edalatian, M. R. (2015). Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(5), 1–6.
- De Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa M. M., Dias, F. S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96–103.

- De Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Penna, A. L. B. (2015). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 65(2), 899–910.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics compensation for lactase insufficiency. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), 421S–429S.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438–442.
- Demirci, Y., Hemme, D. (1995). Acidification test based on the use of biomass for screening of *Leuconostoc*. Application to *Ln. mesenteroides* strains isolated from French raw milk cheeses. *Journal of Dairy Research*, 62(3), 521-527.
- Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., Kostov, G. (2017). Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: mechanisms of interaction and methods of examination. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs (A. Méndez-Vilas, Ed.)*, p. 201-2012.
- Devi, S. M., Ramaswamy, A. M., Halami, P. M. (2014). *In situ* production of pediocin PA-1 like bacteriocin by different genera of lactic acid bacteria in soymilk fermentation and evaluation of sensory properties of the fermented soy curd. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3325–3332.
- Devi, S. M., Archer, A. C., Halami, P. M. (2015). Screening, Characterization and *In Vitro* Evaluation of Probiotic Properties Among Lactic Acid Bacteria Through Comparative Analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(3), 181–192.
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P. (2006). The genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: Dworkin, M., Falkow S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (eds.). *The prokaryotes “third edition”: A handbook on the Biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer, Singapore, p. 165.
- Diana, C. R., Humberto, H. S., Jorge, Y. F. (2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 107–117.
- Dicks, L.M. and Holzapfel, W.H. (2009). Genus II. *Oenococcus* . In : De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (eds.). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* 2 ed., Vol. 3, Springer, pp. 635-642.
- Eberlein, V. (2007). Hygienic status of camel milk in Dubai (United Arab Emirates) under two different milking management systems. Doctoral dissertation, Ludwig-Maxmillians-Universit, Munich, Germany.
- El-Agamy, E. (2006). Camel milk. In: Park, W. Y., Haenlein, G. F. W. (eds). *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Blackwell Publishing, USA. pp. 297-338.

- El-Fakharany, E. M., Tabll, A., El-Wahab, A. A., Haroun, B. M., Redwan, E. R. M. (2008). Potential activity of camel milk- α -amylase and lactoferrin against hepatitis C virus infectivity in HepG2 and lymphocytes. *Hepatitis Monthly*, 8(2), 101–109.
- Elhosseney, M., Gwida, M., Elsherbini, M., Abu Samra, R., Al Ashmawy, M. (2018). Evaluation of physicochemical properties and microbiological quality of camel milk from Egypt. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 7(3), 92–97.
- El-Jeni, R., El Boura, M., Calo-Mata, P., Böhme, K., Fernández-Nod, I., C., Barros-Velázquez, J., Bouhaouala-Zahar, B. (2016). *In-vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(1), 60-71.
- El-Ziney, M. G., Al-Turki, A. I. (2007). Microbiological quality and safety assessment of camel milk (*Camelus dromedaries*) in Saudi Arabia (Qassim region). *Applied Ecology and Environmental Research*, 5(2), 115–122.
- Endo, A., Dicks, L.M.T. (2014). Physiology of the LAB. In: Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (eds.). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. pp. 13-30.
- Evivie, S. E., Huo, G. C., Igene, J. O., Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & nutrition research*, 61(1), 1-16.
- FAO. (1982). FAO Animal Production and Health Papers. Camels and Camel Milk. Food Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO/WHO. (2002). Joint working group report on guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.
- FAOSTAT. Dairy production and products. Accessed at <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/camels/en/> on 27th of January, 2020.
- Farah, Z. (1993). Composition and characteristics of camel milk. *The Journal of dairy research*, 60(4), 603–626.
- Farinha, L., Sabo, S., Porto, M.C., Souza, E.C., Oliveira, M.N., Oliveira, R.P.S. (2015). Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 313-318.
- Fguiri, I., Ziadi, M., Rekaya, K., Arroum, S., Khorchani, T. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of yogurt. *Food Science & Nutrition*, 3(3), 1–8.
- Fossi, B.T., Tavea, F. (2013). Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 in fermentation for simultaneous production of thermostable α -amylase and lactic acid. In: Kongo, J.M. (ed.). *Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech Publisher, p. 633-658.
- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76–88.

- Gagnon, M. (2007). *Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale: Analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins*. Thèse de doctorat. Université Laval.
- Gebreselassie, N., Abay, F., Beyene, F. (2016). Biochemical and molecular identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Ethiopian naturally fermented buttermilk. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 184–196.
- Genta, M. L., Heluane, H. (2001). Biochemical identification of most frequently encountered bacteria that cause food spoilage. In: Spencer, J. F. T., Ragout de Spencer, A. L. *Food Microbiology Protocols*. Humana Press Inc., Totowa NJ. pp. 11-24.
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 1270–1275.
- Ghita, I., Azzam, M. A., El Sayed, N. H., Sadek, Z. I., Abdel-Khalek, A. B., Emara, A. M. (2015). Probiotic characteristics of some bifidobacteria and leuconostoc strains and growth behavior of the selected strains with different prebiotics. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 789–802.
- Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In: Holzappel, W.H., Wood, B.J.B. (eds.). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. pp. 45–54.
- Gómez, N.C., Ramiro, J.M.P., Quecan, B.X.V., de Melo Franco, B.D.G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 863.
- García-Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C., Lopez, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. In: Mayo, B., López, P., Pérez-Martín, G. (eds.). *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. Research Signpost, India, pp. 65-88.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. de A. F., Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470.
- Guinane, C.M., Crispie, F., Cotter, P.D. (2016). Value of Microbial Genome Sequencing for Probiotic Strain Identification and Characterization: Promises and Pitfalls. In: Hyland, N., Stanton, C. (eds). *The Gut-Brain Axis Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota*. Elsevier Inc., UK. pp. 45-60.
- Guiraud, J. P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. pp.397-402
- Gupta, A., Sharma, N. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria-*Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli- a traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, 02(01), 1–11.

- Han, K. J., Lee, N. K., Park, H., Paik, H. D. (2015). Anticancer and Anti-Inflammatory Activity of Probiotic *Lactococcus lactis* NK34. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(10), 1697–1701.
- Harding, F. (1995). Hygienic quality In: Harding F. (ed.). *Milk Quality*. Springer, USA. pp. 40-59.
- Holzapfel, W. H., Björkroth, J., Dicks, L. M. T. (2009). Genus I. *Leuconostoc*. In : De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (eds.). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* 2 ed., Vol. 3, Springer, pp. 624-634.
- Ishibashi, N., Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), 465S–470S.
- Iyer, B. K., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2011). Characterization and *in vitro* probiotic evaluation of lactic acid bacteria isolated from idli batter. *Journal of food science and technology*, 50(6), 1114–1121.
- Jans, C., Bugnard, J., Njage, P. M. K., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 371–379.
- Jilo, K., Tegegne, D. (2016). Chemical Composition and Medicinal Values of Camel Milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 4(4), 13–25.
- Jrad, Z., El Hatmi, H., Fguiri, I., Arroum, S., Assadi, M., Khorchani, T. (2013). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Tunisian camel milk. *African Journal of Microbiology Research Full*, 7(12), 1002–1008.
- Kacem, M., Karam, N.E. (2006a). *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 1(1), 27-32.
- Kacem, M., Karam N.E. (2006b). Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made. *Grasas y Aceites*, 57(2), 198–204.
- Kaindi, D. W. M., Schelling, E., Wangoh, J., Imungi, J. K., Farah, Z., Meile, L. (2011). Microbiological quality of raw camel milk across the Kenyan market chain. *Food*, 5(1), 79–83.
- Kamoun, M. (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. In : Tisserand, J.-L. (ed.). *Elevage et alimentation du dromadaire*. Zaragoza : CIHEAM, 1995. p. 81-103.
- Karam, N-E, Dellali, A., Zadi-Karam, H. (2012). *Lipolytic Activity from Lactic Bacteria*. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 19.

- Karimi, R., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A.M. (2012). Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 437–452.
- Kaskous, S. (2016). Importance of camel milk for human health. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(3), 158–163.
- Kempler, G. M., McKay, L. L. (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), 926–927.
- Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*, 164(1), 81–91.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., Okonogi, S. (2008). Probiotic properties of lactobacilli isolated from Thai traditional food. *Scientia Pharmaceutica*, 76(3), 485-503.
- Kneifel, W., Rajal, A., Kulbe, K. D. (2000). *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(1), 27–34.
- Konuray, G., Erginkaya, Z. (2017). Antimicrobial Effect of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.). 213-218.
- Konuspayeva, G., Loiseau, G., Faye, B. (2004). La plus-value "santé" du lait de chamelle cru et fermenté: l'expérience du Kazakhstan. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 11, 47-50.
- Korashy, H. M., Maayah, Z. H., Abd-Allah, A. R., El-Kadi, A. O., Alhaider, A. A. (2012). Camel milk triggers apoptotic signaling pathways in human hepatoma HepG2 and breast cancer MCF7 cell lines through transcriptional mechanism. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 593195.
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981–987.
- Krausova, G., Hysrlova, I., Jakubec, M., Hynstova, I. (2016). *In Vitro* Evaluation of Prebiotics on Adherence of Lactobacilli. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 08(01), 6–8.
- Lahtinen, S., Salminen, S. (2009a). Commercially available human probiotic microorganisms. In: Lee, Y.K., Salminen, S., (eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America. p. 492.
- Lahtinen, S., Salminen, S. (2009b). Mechanisms of probiotics. In: Lee, Y.K., Salminen, S. (eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America, pp. 377- 440.

- Ledenbach, L. H., Marshall, R. T. (2009). Microbiological spoilage of dairy products In: Sperber W. H., Doyle M. P. (eds.). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and beverages, food microbiology and food safety*. Springer, New York. pp. 41-62.
- Lee, Y.K. (2009a). Probiotics. In: Lee, Y.K., Salminen, S. (eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America pp. 1-176.
- Lee, Y.K. (2009b). Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In: Lee, Y.K., Salminen, S. (eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons Inc., United States of America. pp. 177-188.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: Zhang, H., Cai, Y. (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. pp. 103-204.
- Lore, T.A., Mbugua, S.K., Wangoh, J. (2005): Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT-Food Science and Technology*, 38 (2), 125-130.
- Makgoeng, T., Seifu, E., Sekwati-Monang, B., Sonno, K. (2018). Composition and microbial quality of camel milk produced in Tsabong, south-western Botswana. *Livestock Research for Rural Development*. 30, Article 43.
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 130(3), 219–226.
- Matofari, J. W., Shalo, P. L., Younan, M., Nanua, J. N., Adongo, A., Qabale and Misiko, B. N. (2013). Analysis of microbial quality and safety of camel (*Camelus dromedarius*) milk chain and implications in Kenya. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 5(3), 50–54.
- Mayo, B., Aleksandrak- Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P., Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi, F. Raya, R.R. Vignolo, G.M. (eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Blackwell Publishing, USA. pp. 3-34.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655.
- Meribai, A. (2018). *Elaboration d'un levain lactique thermophile, d'intérêt technologique, isolé du lait d'espèce cameline d'Algerie*. Thèse de doctorat, université d'Oran 1.
- Merzouk, Y., Chahrour, W., Zarour, K., Zergui, A., Saidi, N., Henni, J. E., Kihal, M. (2013). Physico-chemical and microbiological analysis of Algerian raw camel's milk and identification of predominating thermophilic lactic acid bacteria. *Journal of Food Science and Engineering*, 3 (2013), 55-63.

- Mokdad, F. H., Benmechernene, Z., Benyoucef, A., Russo, N. (2020). Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks. *Il Ponte*, 76(3/1), 32-61.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1255.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Todorov, S. D., Silva, A., Jr, Franco, B. D., Nero, L. A. (2012). Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 318–328.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., Brasca, M. (2013). Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Journal of Dairy Research*, 80 (4), 457–466.
- Moulay, M., Benlahcen, K., Aggad, H., Kihal, M. (2013). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk. *Advances in Environmental Biology*, 7(6), 999–1007.
- Muller, J. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2009). Manufacture of probiotic bacteria. In: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (eds.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer, New York, NY. 725-760.
- Muryany, M. Y. I., Salwany, M. Y. I., Ghazali, A. R., Hing, H. L., Nor Fadilah, R. (2017). Identification and characterization of the Lactic Acid Bacteria isolated from Malaysian fermented fish (Pekasam). *International Food Research Journal*, 24(2), 868–875.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambangan (Mangifera pajang). *CyTA - Journal of Food*, 13(4), 563–572.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., Cabezas, L. (2010). Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food microbiology*, 27(1), 85–93.
- Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. (2010). Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *European Food Research and Technology*, 231(6), 925–931.
- Ogier, J. C., Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 291–301.
- Oliveira, R. B. P., Oliveira, A., de L., Glória, M.B.A. (2008). Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. *Brazilian journal of microbiology*, 39(2), 368–374.
- Omer, R. H., Eltinay, A. H. (2008). Short Communication: Microbial quality of camel's raw milk in central and southern regions of United Arab Emirates. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 20(1), 76–83.

- Ouwehand, A. C., Salminen, S. (2003). *In vitro* Adhesion Assays for Probiotics and their *in vivo* Relevance: A Review. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(4), 175–184.
- Ouwehand, A. C., S. Vesterlund. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., A. von Wright, A. Ouwehand, (eds.). *Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects*. 3rd edn. Marcel Dekker, New York, pp. 375–395.
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjan, N. R., Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357–362.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, 6(58), 1-28.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., Angelis, M. De, Gobetti, M., Kleerebezem, M., ... Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837–890.
- Paramithiotis, S., Papoutsis, G., Drosinos, E.H. (2017). Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables: An Overview. In: Paramithiotis, S. (ed.). *Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables*. CRC Press Taylor & Francis Group, Sound Parkway NW. pp.1-18.
- Park, W.Y., Haenlein, G. F. W. (2006). *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Blackwell Publishing, USA.
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12.
- Pintado, M.M. Gomes, A.M., Freitas, A.C. (2014a). Probiotic Bacteria: From Science to Consumers' Benefit. In: Sousae Silva, J.P., Freitas, A.C. *Probiotic bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects.*, CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 1-6.
- Pintado, M.M., Gomes, A.M., Freitas, A.C. (2014b). Probiotics and Their Therapeutic Role. In: Sousae Silva, J., P., Freitas, A.C. *Probiotic bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects.*, CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 47-94.
- Polak-Berecka, M., Wasko, A., Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales Universitatis Mariae Curie – Sklodowska Lublin–Polonia*, 64, 15-24.
- Pundir, R. K., Rana, S., Kashyap, N., Kaur, A. (2013). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: An in vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(3), 85–93.
- Rahman, I.E., Dirar, H.A., Osman, M.A. (2009). Microbiological and biochemical changes and sensory evaluation of camel milk fermented by selected bacterial starter cultures, *African Journal of Food Science*, 3(12), 398-405.

- Rahmeh, R., Alomirah, H., Akbar, A., Sidhu, J. (2019). Composition and Properties of camel Milk. In milk production, processing and marketing. IntechOpen.
- Rather, I., Choi, K.H., Bajpai, V. K., Park, Y.H. (2015). Antiviral mode of action of *Lactobacillus plantarum* YML009 on Influenza virus H1N1. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(2), 475-482.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology advances*, 26(1), 22–34.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124–140.
- Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D., Dapkevicius, M. L., Silva, C. C. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of applied microbiology*, 116(3), 573–585.
- Rossoni, R.D., de Camargo Ribeiro, F., de Barros, P.P., Mylonakis, E., Junqueira, J.C. (2020). A Prerequisite for Health: Probiotics. *Microbiomics*, 225–244.
- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., Mozzi, F. (2019). Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 1091.
- Ruiz, P., Barragán, I., Seseña, S., Palop, M. L. (2016). Functional properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from goat colostrum for application in food fermentations. *International journal of dairy Technology*, 69(4), 559–568.
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of physiology and biochemistry*, 65(3), 315–328.
- Sanz, Y., Santacruz, A. (2010). Probiotics and Prebiotics in Metabolic Disorders and Obesity. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (eds.). *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, Academic Press is an imprint of Elsevier, USA. pp. 237-258.
- Sathyapriya, A., Anitha, A. (2018). Assessment of Probiotic Potential *Leuconostoc mesenteroides* from Natural Microbiota. *International Journal of Scientific Research Biological Sciences*, 5(6), 26–33.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N., Traore, A.S. (2009). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3), 174–179.
- Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., Pilarski, F. (2015). Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Advances in Microbiology*, 5 (6), 409–424.

- Sharma, R. (2006). Chemical and microbiological analysis of milk and milk products. International book distributing Co, India, pp. 9-33.
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65–75.
- Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Jahromi, M. F., Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed research international*, 2014, 1-16.
- Shukla, R., Iliev, I., Goyal, A. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 3(1), 79-87.
- Siboukeur, O. (2007). *Etude du lait camelin collecté localement: caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques; aptitudes à la coagulation*. Thèse de Doctorat En Sciences Agronomiques. Université INA El-Harrach, Alger.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U. (2016). Diet on non-cow milk composition. In: Tsakalidou E., Papadimitriou K. (Eds). Non-bovine milk and milk products. London, UK: Elsevier and AP publ. pp. 61-75.
- Singh, R., Mal, G., Kumar, D., Patil, N. V., Pathak, K. M. L. (2017). Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agricultural Research*, 6(4), 327–340.
- Snydman, D.R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 (s2), S104–S151.
- Sodini, I., Lucas, A., Oliveria, M.N., Remeuf, F., Corrieu, G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture and probiotics cell counts in fermented milk processing. *Journal of dairy Science*, 85 (10), 2479-2488.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., Matosic, S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296–307.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Wszolek, M., Ghoddousi, H., Linares, D.M., Shah, N.P. (2018). Production and Maintaining Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. In: Tamime, A.Y., Thomas, L.V. (eds.). Probiotic Dairy Products. John Wiley & Sons Ltd, India. pp. (67-164).
- Thomas, T.D. (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *New Zealand journal of dairy science and technology*, 8, 70-71.
- Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B. (2014). Phylogenetics and systematics. In: Holzappel, W.H., Wood, B.J.B. (Eds). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. pp. 31–44.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H., Verstraete, W. (1992). Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *The Journal of applied bacteriology*, 72(3), 214–219.

- Vizoso Pinto, M. G., Franz, C. M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W. H. (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology*, 109(3), 205–214.
- Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I., Killer, J. (2006). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livestock Science.*, 105 (1-3), 253-259.
- von Wright, A. (2019). Genus *Lactococcus*. In: Vinderola, G., Ouwehand, A.C., Salminen, S. von Wright, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects Fifth Edition Taylor & Francis Group, LLC. pp. 33-46.
- von Wright, A., Axelsson, L. (2019). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Vinderola, G., Ouwehand, A.C., Salminen, S. von Wright, A. (eds.). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects Fifth Edition, Taylor & Francis Group, LLC. pp.1-16.
- Walling, E., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A. (2001). La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. *Le Lait*, 81 (1-2), 289-300.
- Wernery, U. (2007). Camel milk–new observations. Proceedings of the International Camel Conference, CVAS, Bikaner. 200-204.
- Worku, T., Negera, E., Nurfeta, A., Welearegay, H. (2012). Microbiological quality and safety of raw milk collected from Borana pastoral community, Oromia Regional State. *African Journal of Food Science and Technology*, 3(9), 213–222.
- Yadav, R., Shukla, P. (2017). Probiotics for Human Health: Current Progress and Applications. In: Shukla, P. (ed.), Recent Advances in Applied Microbiology. Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp.133–147.
- Yam, B. A. Z., Khomeiri, M., Mahounak, A. S., Jafari, S. M. (2014). Hygienic quality of camel milk and fermented camel milk (Chal) in golestan province, Iran. *Journal of Microbiology Research*, 4(2), 98–103.
- Yateem, A., Balba, M.T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*, 3(4), 194–199.
- Younan, M. Milk hygiene and udder health. (2004). In: Farah, Z., Fischer, A. (eds.). Milk and meat from the camel - Handbook on products and processing-, vdf Hochschulverlag an der ETH Zürich, Switzerland, pp. 67–76.
- Zadi Karam, H., Karam, N. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicultura*, 24 (3), 153-156.

- Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-boudjemaa, B., Henni, J. E., Kihal, M. (2013). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroïdes* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technologie*, 5(1), 39-47.
- Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Pérez, P., De Antoni, G. (1998). Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. *Journal of food protection*, 61(7), 865–873.
- Zdolec, N., Filipović, I, Fleck, Ž.C., Marić, A., Jankuloski, D., Kozačinski, L., Njari, B. (2011). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. *Veterinarski Arhiv*, 81(1), 247–258.
- Zhang, W., Liu, M., Dai, X. (2013). Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Brazilian journal of microbiology*, 44(3), 685–691.
- Zibae, S., Hosseini, S.M.A.-R., Yousefi, M., Taghipour, A., Kiani, M. A., Noras, M. R. (2015). Nutritional and Therapeutic Characteristics of Camel Milk in Children: A Systematic Review. *Electronic physician*, 7(7), 1523–1528.
- Zielińska, D., Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed research international*, 2018, 1-15.
- Zoumpopoulou, G., Kazou, M., Alexandraki, V., Angelopoulou, A., Papadimitriou, K., Pot, B., Tsakalidou, E. (2018). Probiotics and Prebiotics: An Overview on Recent Trends. In: Di Gioia, D., Biavati, B. (eds). *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Springer International Publishing AG, Switzerland. pp. 1-34

Annexes

1- Milieux de culture

Gélose MRS (Fluka) (Quantité en g)

Peptone	10
Extrait de viande	8,0
Extrait de levure	4,0
D(+)-Glucose	20
Dipotassium hydrogen phosphate	2,0
Acétate de sodium trihydraté	5,0
Citrate triammonique	2,0
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2
Sulfate de manganèse tetrahydraté	0,05
Agar	15
Tween 80	1 mL
Eau distillée qsp	1L
pH 6.5 +/- 0.2 à 37 °C. Autoclavage à 121 °C pendant 15min	

Gélose M17 (Pronadisa) (Quantité en g)

Glycérophosphate sodique	19
Peptone de soja	5,0
Extrait de viande	5,0
Lactose	5,0
Peptone de viande	2,5
Peptone de caséine	2,5
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,2
Agar bactériologique	12,75
Eau distillée qsp	1L
pH final: 6.9 ± 0.2 à 25 °C. Autoclavage à 121 °C pendant 15min	

MRS sans citrate (production de CO₂) (Quantité en g)

Peptones	10
Extrait de viande	8,0
Extrait de levure	4,0
D(+)-Glucose	20
Dipotassium hydrogen phosphate	2,0
Acétate de sodium trihydraté	5,0
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2
Sulfate de manganèse tetrahydraté	0,05
Agar	15
Eau distillée qsp	1L
pH final : 6,2 Autoclavage à 121 °C pendant 15min	

M16 BCP (Thomas, 1973) (Quantité en g)

Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Lactose	2
Biopolytone	5
Peptone papainique de soja	5
Acide ascorbique	0,5
Acétate de sodium	1,8
L-Arginine	4
Pourpre de bromocrésol	0,05
Eau distillée	1000 mL
pH=6,5 Autoclavage 120C°pendant 20 mn	

Bouillon au lactose (Quantité en g)

Peptones	10
NaCl	15
Rouge de phénol	0,018
lactose	5
Eau distillée	1L
pH final : 7 Autoclavage 120C°pendant 20 mn	

Gélose à amidon (Quantité en g)

Amidon soluble	10g
Peptones	5g
Extrait de levure	5g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01g
NaCl	0,01g
Agar	15g
Ajustement du pH à 6,5	

Milieu MSE (Mayeux Sandine et Elliker) (Quantité en g)

Tryptone	10,0 g
Gélatine	2,5 g
Extrait autolytique de levure	5,0 g
Saccharose	100,0 g
Glucose	5,0 g
Citrate d'ammonium	1,0 g
Azide de sodium	0,075 g
Agar	15,0 g

Autoclaver le milieu obtenu 20 mins à 110 °C.

Milieu KMK (Quantité en g/100mL)

Lait écrémé	1
Peptones	0,25
Glucose	0,5
Agar	1,5
H ₂ O qsp	100 mL

Le pH a été ajusté à 6,6

La stérilisation du milieu se fait à 110 °C pendant 10 min, 0,5 bar. Après refroidissement à 45 °C et on ajoute 2 solutions :

Solution A :

10% de ferricyanide potassium

Solution B :

1 g citrate de fer

1 g citrate de sodium

Les 2 solutions ont été stérilisées par filtration et 10 mL de chaque solution ont été ajoutés à 1 L du milieu gélosé, bien mélangés puis versés dans des boîtes de Pétri.

Gelatine agar (Quantité en g)

Gélatine	30
Peptones	5
Extrait de levure	3
Agar	17
Eau distillée	1L
Ajustement du pH à 6,5	

2- Tampons et réactifs

Tampon phosphate potassium (50mM, pH 6,5).

K ₂ hPO ₄ : 174,18 g /mole quantité pesée pour 18 mL	3,135g
KH ₂ PO ₄ : 136,09 g/mole quantité pesée pour 32 mL	4,35g
On complète le volume à 1000mL afin d'avoir un pH=6.5	

Préparation du tampon PBS

Na ₂ hPO ₄	1.27g
NaH ₂ PO ₄	0.44g
NaCl	8g
Eau distillée qsp	1L
pH final égal à 7,2	

VPI (Hydroxide de potassium) à 40% :

Potasse	40g
Eau distillée :	100 mL

VPII (α . naphthol) 5%:

Ethanol absolu :	100 mL
α . Naphthol :	5g

من أجل تقييم الجودة الميكروبيولوجية لحليب النوق، تم أخذ 13 عينة من كل ناقة على حدى في ظروف صحية صارمة من مناطق مختلفة من جنوب شرق الجزائر. نتائج القياسات بينت أن قيم الـ pH تتغير من (6,46-6,77) كما أجمعت جميع عينات الحليب أزرق الميثيلين بعد أربع ساعات، مما يشير إلى أنه من المحتمل أن يكون ذا جودة ميكروبيولوجية جيدة. لوزايريم عدد الخلايا / مل لكل من: *FAMT*, *Enterococcus*, *Staphylococcus spp.* الخمائر والغنفيات تراوح ما بين (3,25-1,69)، (3,17-1,69)، (0,00-3,9) و (2,3-0,95) على الترتيب. عدد *Enterobacteriaceae* كان منعدما في 69,23% من عينات الحليب التي تم فحصها ولم يتجاوز لوزايريم عدد الوحدات المكثبة للمستعمرات 1,30 / مل. من هذه النتائج، يبدو أنه على الرغم من أن حليب النوق وتخزينه ونقله تم في ظروف صحية جيدة؛ غير أننا سجلنا نسبة مرتفعة من *Staphylococcus spp.* مما يحد من استهلاكه في الحالة الخام خاصة من طرف الأشخاص ذوو مناعة ضعيفة.

تم تخمير العينات السابقة تلقائيا لعزل ودراسة خصائص سلالات بروبيوتيك جديدة محتملة من البكتيريا اللبنية. 9 سلالات فقط من أصل 78 بكتيريا اللبن تعتبر بروبيوتيك. كلها فعالة ضد البكتيريا المسببة للأمراض ولها خصائص لاصقة. لم تكن هناك سلالة قادرة على النمو لما يكون الـ pH الوسط مساويا لـ 2 في حين جميعها أظهرت مقاومة عالية عند 3 pH مقارنة بالأمل (6,2). بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع السلالات تحملا جيدا للأحماض الصفراوية. لكن ولا عزلة بكتيرية تحملت 0,4% من الفينول خلال 24 ساعة من التعرض.

أظهرت نتائج السلامة لسلالات البروبيوتيك التسعة المشتبه بها غياب نشاطية β ، الهيموليتيك، الجيلاتيناز، DNase، والتخثر. كما أنها حساسة لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم تحديد النمط الظاهري لها على أنها تنتمي إلى جنس *Leuconostoc* وأظهرت تسلسلات النيوكليوتيدات في الـ ARNr16S مع 99-94% مع *Leuconostoc mesenteroides*.

تم تقييم الخصائص الغذائية والتكنولوجية لهذه السلالات. أظهرت النتائج أن جميعها قادرة على استقلاب اللاكتوز، وإنتاج ثنائي الأستيل من السبترات، وتحلل البروتينات بأقطار تتراوح بين: (18,5 م - 29 م) ممثلة بـ MS11 و MS12 على التوالي. ومع ذلك، فهي ليست محملة بالدهون أو النشاء وغير قادرة على إنتاج الأستيون. باستثناء سلالتين ضعيفتي الحموضة (MS4 و MS12)، باقي العزلات الأخرى لا تحمض الحليب. أما القدرة على تخمير الكربوهيدرات (الجلوكوز، السكروز، اللاكتوز، الفركتوز، FOS) فإنها مختلفة بين العزلات البكتيرية السابقة.

أشارت النتائج الإيجابية المتحصل عليها في هذه الدراسة أن حليب النوق رغم خصائصه الطبية والعلاجية إلا أن استهلاكه على الشكل الخام ليس سليما، كما أنه بعد تخميره يحتوي على عزلات تنتمي إلى *Leuconostoc mesenteroides* يمكن أن تكون مرشحة لأن تكون بكتيريا بروبيوتيك باستعمالات تكنولوجية واعدة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبن، بروبيوتيك، الجودة الميكروبيولوجية، الخصائص التكنولوجية، حليب النوق، *Ln. mesenteroides*

Résumé

Afin d'évaluer la qualité microbiologique du lait de chamelle du sud-est algérien, 13 chammelles ont été prélevées selon les normes d'hygiène. Les valeurs de pH varient entre (6,46-6,77) et tous les échantillons de lait ont eu pour effet de réduire le bleu de méthylène après 4 heures, indiquant qu'il est probablement de bonne qualité microbiologique. Le nombre (Log/mL) de la FAMT, *Enterococcus*, *Staphylococcus spp.*, levures et moisissures est compris entre (1,69-3,25), (1,69-3,17), (0,00-3,39) et (0,95-2,3) respectivement. Les entérobactéries sont absentes dans 69,23% des échantillons de lait examinés et n'ont pas dépassé Log 1,30 UFC/mL. D'après ces résultats, il s'avère que même si les conditions d'hygiène de la traite, du stockage et du transport du lait de chamelle sont améliorées ; une fréquence relativement élevée de *Staphylococcus spp.* a été notée ce qui limite sa consommation à l'état cru surtout par les personnes immunodéprimées.

Ces échantillons de lait ont été fermentés spontanément pour isoler et étudier *in vitro* les caractéristiques de nouvelles souches probiotiques. Seulement 9 souches sur 78 LAB isolées ont des propriétés probiotiques. Elles sont toutes actives vis-à-vis des bactéries pathogènes et possèdent des propriétés adhésives importantes. Aucune souche n'a pu se développer au pH 2 mais toutes ont montré une résistance considérable à pH 3 par rapport à celui optimum (pH 6,2). De plus, toutes les souches ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires. Néanmoins, aucune souche n'a pu résister à 0,4% de phénols pendant 24 h d'exposition. L'évaluation de leur sécurité a montré l'absence d'une activité β hémolytique, gélatinase, DNase et coagulase. Comme elles sont sensibles à la plupart des antibiotiques testés. Ces souches probiotiques sont identifiées phénotypiquement comme appartenant au genre *Leuconostoc*. Les séquences nucléotidiques de leur ARNr 16S ont montré une similitude de 94 à 99 % avec *Leuconostoc mesenteroides*.

Les propriétés nutritionnelles et technologiques de ces souches ont été évaluées. Les résultats montrent que toutes les souches sont capables de métaboliser le lactose, de produire le diacétyl à partir du citrate, de dégrader les protéines avec des diamètres de lyse variant entre : (18,5 mm-29 mm) représentés par les souches MS11 et MS12 respectivement. Toutefois, elles ne sont pas lipolytiques ni amylolytiques et incapables de produire l'acétoïne. A l'exception de 2 souches faiblement acidifiantes (MS4 et MS12), les autres n'acidifient pas le lait. Une capacité de fermentation des glucides (glucose, saccharose, lactose, fructose, FOS) est variable entre les souches.

Les résultats globaux obtenus indiquent l'insécurité de consommation du lait de chamelle à l'état cru et que les isolats de *Leuconostoc mesenteroides* pourraient servir comme candidats probiotiques et technologiques prometteurs.

Mots clés : LAB, lait de chamelle, *Ln. mesenteroides*, probiotique, propriétés technologiques, qualité microbiologique.

Abstract

In order to evaluate the microbiological quality of camel milk from south-eastern Algeria, 13 camels were sampled according to hygiene standards. The pH values ranged from (6.46-6.77) and all milk samples reduce methylene blue after 4 hours, indicating that it is probably of good microbiological quality. The number (Log/mL) of FAMT, *Enterococcus*, *Staphylococcus spp.*, yeasts and moulds is ranging from: (1.69-3.25), (1.69-3.17), (0.00-3.39) and (0.95-2.3) respectively. *Enterobacteriaceae* were absent in 69.23% of the milk samples examined and did not exceed Log 1.30 CFU/mL. From these results, it appears that although the hygienic conditions of milking, storage and transport of camel milk are improved; a relatively high frequency of *Staphylococcus spp.* was noted, which limits its consumption in the raw state especially by immunocompromised persons.

These milk samples were spontaneously fermented to isolate and study *in vitro* the characteristics of new probiotic strains. Only 9 strains out of 78 LAB isolated have probiotic properties. They are all active against pathogenic bacteria and have important adhesive properties. No strain was able to develop at pH 2 but all showed considerable resistance at pH 3 compared to the optimum pH (6.2). In addition, all strains showed a good tolerance to bile salts. Nevertheless, no strain was able to resist 0.4% phenols for 24 hours of exposure. The evaluation of their safety showed the absence of β hemolytic activity, gelatinase, DNase and coagulase. As they are sensitive to most of the antibiotics tested. These probiotic strains are phenotypically identified as belonging to the genus *Leuconostoc*. The nucleotide sequences of their 16S rRNA showed 94-99% similarity to *Leuconostoc mesenteroides*.

The nutritional and technological properties of these strains have been evaluated. Results show that all strains are capable of metabolizing lactose, producing diacetyl from citrate, degrading proteins with lysis diameters ranging from: (18.5 mm-29 mm) represented by strains MS11 and MS12 respectively. However, they are neither lipolytic nor amylolytic and are incapable of producing acetoin. With the exception of 2 weakly acidifying strains (MS4 and MS12), the others do not acidify milk. The ability to ferment carbohydrates (glucose, sucrose, lactose, fructose, FOS) varies between strains.

The overall results obtained indicate that camel milk is unsafe to consume in its raw state and that *Leuconostoc mesenteroides* isolates could serve as promising probiotic and technological candidates.

Key words: LAB, camel milk, *Ln. mesenteroides*, probiotic, technological properties, microbiological quality.